

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 33/543, 27/327		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/27367
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. Juni 1999 (03.06.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/07494		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 20. November 1998 (20.11.98)		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(30) Prioritätsdaten: 197 51 706.4 21. November 1997 (21.11.97) DE 198 22 123.1 8. Mai 1998 (08.05.98) DE			
(71)(72) Anmelder und Erfinder: KNOLL, Meinhard [DE/DE]; Geschwister-Scholl-Strasse 9, D-48565 Steinfurt (DE).			
(74) Anwalt: PFENNING, MEINIG & PARTNER; Kurfürstendamm 170, D-10707 Berlin (DE).			

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR DETECTING ANALYTES

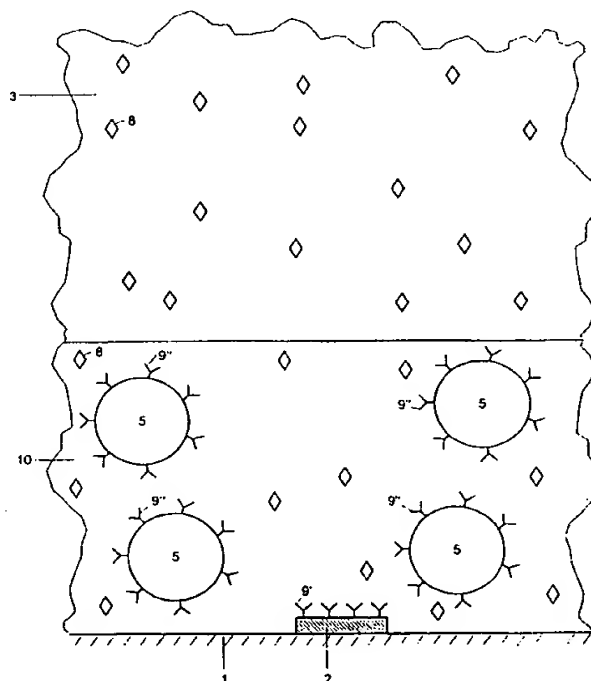
(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON ANALYTEN

(57) Abstract

The invention relates to a method for detecting analytes and to a device for carrying out the method, for use for analysis or diagnosis in the fields of chemistry, biochemistry, molecular genetics, food chemistry, biotechnology, the environment and medicine. Marker particles (5) with different electrical properties or a different relative permeability to those of the measuring solution (3) surrounding them are used to detect the analytes (8). The marker particles (5) either bond specifically to the analytes (8) or to a base (2) in competition with the analyte. The analytes (8) are detected by the changes in an electrical field or an electrical current generated by electrodes (2) or in an electrical voltage applied to an electrode or in a magnetic field, said changes being caused by marker particles which have bonded with the analytes or by marker particles which have instead bonded to the base in an electrical field.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Analyten und eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens. Diese werden zur Analytik oder Diagnostik im Bereich der Chemie, Biochemie, Molekulargenetik, Lebensmittelchemie, Biotechnologie, im Umweltbereich sowie in der Medizin eingesetzt. Zum Nachweis von Analyten (8) werden Markerpartikel (5) verwendet, deren elektrische Eigenschaften bzw. deren Permeabilitätszahl von denjenigen der sie umgebenden Messlösung (3) verschieden sind. Die Markerpartikel (5) binden spezifisch an den Analyten (8) oder kompetitiv zum Analyten an eine Unterlage (2). Die Analyte (8) werden über die Änderungen eines von Elektroden (2) erzeugten elektrischen Feldes bzw. eines elektrischen Stroms oder einer elektrischen Spannung an einer Elektrode oder eines magnetischen Feldes nachgewiesen, die von an ihnen gebundenen Markerpartikeln (5) oder statt ihrer von an die Unterlage gebundenen Markerpartikeln in einem elektrischen Feld hervorgerufen werden.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Vorrichtung und Verfahren zum Nachweis von Analyten

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Analyten und eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

5

Solche Vorrichtungen und Verfahren, die im folgenden auch mit dem beides beschreibenden Begriff des Assays bezeichnet werden, dienen zur qualitativen und quantitativen Erfassung von spezifischen Bindungen zwischen mindestens zwei Molekülen. Hierzu zählt zum Beispiel die Erfassung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen, Antikörper-Antigen-Wechselwirkung, die Erkennung von Nukleinsäuren, die Wechselwirkung zwischen Oligonukleotiden und DNA sowie anderer molekularer Wechselwirkungen. Verfahren und Vorrichtungen dieser Art lassen sich zum Beispiel in der Chemie, der klinischen Analytik, der pharmazeutischen Entwicklung, der Umweltanalytik sowie bei Routinearbei-

10

15

ten der Molekularbiologie bis hin zur Sequenzierung von Nukleinsäuren einsetzen.

Es ist bekannt, daß Immunoassays mit unterschiedli-
chen Detektionsmethoden durchgeführt werden. Hierzu
zählen radioaktive, fluoreszenz- und chemoluminis-
zenzgestützte sowie enzymatische Verfahren (C.P. Pri-
ce, D.J. Newman: Principles and Practice of Immunoas-
says, Macmillan Publicers Ltd., 1991 U.K.).

Bei einer besonderen Form von Immunotest kommt es
aufgrund von Antikörper-Antigen-Bindungen zu einer
Agglutination von Latex-Partikeln, die beispielsweise
optisch nachgewiesen werden kann (J.M. Singer, C.M.
Plotz: The Latex Fixation Test, American Journal of
Medicine, Dec. 1965, pp. 888-892). Mit derartigen Ag-
glutinationstests können unter Verwendung von Mikro-
sphären von 10 µm Durchmesser 10^5 Moleküle, von Mi-
krosphären mit einem Durchmesser von 1 µm 10^8 Molekü-
le und von Mikrosphären mit einem Durchmesser von 0,1
µm 10^{13} Moleküle nachgewiesen werden. Am Beispiel von
IgG (MW = 100,000) werden theoretische Empfindlich-
keiten von 10 fM, 10 pM bzw. 10 nM angegeben. Die
höchste Empfindlichkeit ergibt sich also bei relativ
großen Mikrosphären, deren Einsatz allerdings durch
ihr Sedimentationsverhalten begrenzt ist.

Weiterhin können neuerdings Nukleinsäuren, beispiels-
weise Oligonukleotide, RNA und DNA über derartige
Wechselwirkungen mittels der DNA-Mikrochip-Technolo-
gie nachgewiesen werden (Nature, Genetics, Vol. 14,
No. 4, Dec. 96, und D. Noble: DNA Sequencing on a
chip, Anal. Chemistry, Vol. 67, No. 5, March 1,
1995). Hier wird allerdings die Chip-Technologie
nicht als elektrisches Meßverfahren benutzt, sondern
sie dient als neues Syntheseverfahren und zur Erzeu-

5 gung von Mikrostrukturen. Der eigentliche Detektions-
mechanismus ist optischer Art. Die Kombination aus
elektrischen Verfahren zur Synthese eines Liganden
und der optischen Markierung und Detektion ist jedoch
sehr aufwendig.

10 Nachteilig am Stand der Technik ist, daß Nachweisver-
fahren auf radioaktiver Basis mit Strahlenschutz- und
Entsorgungsproblemen des dabei entstehenden radioak-
tiven Mülls behaftet sind. Bei enzymatischen Nach-
weismethoden, die eine elektrochemische Detektion der
Analyte ermöglichen, muß als zusätzlicher Arbeits-
schritt eine chemische Reaktion mit einer Substanz
als chemisches Reaktionssubstrat erfolgen.

15 Bei allen im Stand der Technik bekannten Nachweisver-
fahren und Assays ist ein abschließender Waschschrift
nötig, um vor der Detektion des Analyten überschüssi-
ge Reaktanten zu entfernen, um unspezifische Signale
20 soweit wie möglich zu minimieren.

25 Aufgabe der Erfindung ist es, eine Vorrichtung und
ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, das den Nach-
weis von Analyten auf rasche, einfache und genaue
Weise ermöglicht und bei dem auf einen Waschschrift
verzichtet werden kann.

30 Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Merkmale
des Haupt- und Nebenanspruchs gelöst.

35 Werden Markerpartikeln mit elektrischen und/oder
elektrochemischen Eigenschaften, die sich von denen
ihrer Umgebung, der Meßlösung, unterscheiden in ein
elektrisches Feld gebracht, so wird hierdurch das
elektrische Feld gestört. Diese Störungen eines in

der Meßlösung erzeugten elektrischen Feldes können einfach, rasch und sehr präzise bestimmt werden.

5 Das erfindungsgemäße Verfahren beruht also auf einer Nachweismethode, die als im Wesentlichen rein elektrisch angesehen werden kann. Daher weist es die für die Bestimmung von elektrischen bzw. elektrochemischen Eigenschaften mögliche sehr hohe Empfindlichkeit bzw. Genauigkeit und folglich eine sehr niedrige
10 Nachweisgrenze bei hoher Empfindlichkeit auf.

Bei geeigneter Dimensionierung und/oder Positionierung der Elektroden, die das elektrische Feld erzeugen, wird das elektrische Feld nahezu ausschließlich
15 von Markerpartikeln mit unterschiedlicher stofflicher Zusammensetzung, unterschiedlichem spezifischem Widerstand elektrischer Oberflächenladung oder unterschiedlicher Dielektrizitätskonstante beeinflusst, die beispielsweise mit dem Analyten oder mit einer Unterlage d.h. als Unterlage geeignete Körper bzw. Mate-
20 rialien spezifische Bindungen eingegangen sind. Überschüssige ungebundene Markerpartikel führen zu keinem Signal, so daß ein Waschschriff zur Entfernung ungebundener Markerpartikel aus der Meßlösung entfallen
25 kann.

Der Meßbereich des erfindungsgemäßen Bio-Assays (Verfahren und/oder Vorrichtung) kann durch Festlegung der Elektroden- bzw. Unterlagenoberflächen und durch
30 die Wahl der Größe der Markerpartikel eingestellt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren und die erfindungsgemäße Vorrichtung können zum Nachweis und zur Konzentrationsbestimmung beliebiger, über molekulare Wechselwirkungen erfaßbarer Analyten eingesetzt werden.
35

Zu diesen zählen zum Beispiel die Wechselwirkungen von Rezeptor-Ligand, Antikörper-Antigen, Antikörper-Hapten, Antikörperfragment-Antigen, Aptameren, Proteinen, Nukleinsäuren, Oligonukleotiden, DNA sowie alle molekularen Wechselwirkungen, bei denen mindestens einer der molekularen Partner mit einem Markerpartikel markiert werden kann. Dies reicht bis hin zur Wechselwirkung von Stoffen mit den Oberflächen ganzer Zellen. Es ist prinzipiell möglich, alle bekannten Immunoassay-Formate nach dem Stand der Technik zu realisieren.

Die mit der Erfindung erzielten Vorteile bestehen folglich insbesondere darin, daß eine rein elektrische Nachweismethode mit all ihren Vorteilen in Bezug auf Genauigkeit, Schnelligkeit und Sensitivität eingesetzt wird, und daß ferner bei Verwendung von sehr kleinen Elektroden und Markerpartikeln vergleichbarer Größe ein Einzelbindungsnachweis möglich ist.

Vorteilhafte Weiterbildungen des erfindungsgemäßen Verfahrens und der erfindungsgemäßen Vorrichtung werden in den abhängigen Ansprüchen gegeben.

Insbesondere im Nahfeld einer ein elektrisches Feld erzeugenden Elektrode kann bereits die Anwesenheit eines einzelnen Markerpartikels zu ausreichend hohen Änderungen des elektrischen Feldes führen. Weiter von der Elektrode entfernte, nicht spezifisch gebundene Markerpartikel führen zu geringeren Beeinträchtigungen des elektrischen Feldes, so daß bei geeigneter Anordnung der Elektroden in der Nähe einer Unterlage bzw. Ausbildung der Elektroden selbst als Unterlage und bei geeigneter Konzentration der Markerpartikel das gemessene Signal im wesentlichen nur von spezifisch gebundenen Markerpartikeln beeinflusst wird. Da-

durch kann dann auch ein Waschschrift zur Entfernung von überschüssigen Markerpartikeln oder Analyten aus der Meßlösung entfallen.

5 Bei Verwendung von Markerpartikeln deren Permeabilitätszahl sich von der Permeabilitätszahl der Meßlösung unterscheidet, wobei ein magnetisches Feld an bzw. in der Meßlösung erzeugt wird, kann der Nachweis durch die Stärke des magnetischen Feldes bzw. durch
10 deren von den Markerpartikeln verursachte Änderung erbracht werden.

So kann beispielsweise ein Einzelbindungsnachweis an einer Elektrode als Unterlage erfolgen, deren Oberfläche in der gleichen Größenordnung liegt wie die
15 größte Querschnittsfläche des Markerpartikels oder sich zumindest nicht um mehrere Größenordnungen unterscheidet. Damit können hierfür Mikroelektroden verwendet werden, die runde, quadratische, rechteckige, aber auch beliebige Form haben. Die Durchmesser
20 der Markerpartikel liegen zwischen einigen nm bis einigen μm , beispielsweise bei $10\mu\text{m}$.

Soll das Binden mehrerer Markerpartikel meßtechnisch nachgewiesen werden, so können größere Elektroden
25 verwendet werden, an deren Oberfläche es zu einer flächenhaften Belegung bis hin zu einer dreidimensionalen Agglutination von Markerpartikeln kommt. Im Gegensatz zu den für den Stand der Technik angegebenen
30 Werten für Agglutinationstests sinkt die theoretische Nachweisgrenze in Abhängigkeit vom Durchmesser der Markerpartikel um mehrere Größenordnungen.

Darüber hinaus kann der Meßbereich des Bio-Assays
35 durch Festlegung der Elektrodenoberflächen zwischen

dem Einzelbindungsbereich und dem Agglutinationsbereich eingestellt werden.

5 Bei der Verwendung von nur einer Mikroelektrode oder sehr wenigen Mikroelektroden (mit einer dazugehörigen Gegenelektrode) können dann sehr geringe Analytkonzentrationen erfaßt werden, wenn das die Mikroelektrode(n) umgebende Meßmedium ein nur geringes Volumen mit einer begrenzten Anzahl von Markerpartikeln aufweist. Durch Verwendung einer sehr kleinen Proben- oder Durchflußkammer in der Größenordnung von μl kann daher ein einfacher, präziser Einzelbindungsnachweis realisiert werden.

15 Dies gilt insbesondere beim Nachweis von Analyten durch deren spezifische Bindung an Markerpartikel in einem Durchflußmesssystem, wobei hier der Analytstrom die gebundenen Markerpartikel durch ein von außen über Elektroden angelegtes elektrisches Feld mit sich nimmt. Die Veränderungen des elektrischen Feldes, die sich als Änderungen des elektrischen Stromes bzw. der Kapazität zwischen den Elektroden in der Meßlösung zeigen und die durch die Markerpartikel ausgelöst werden, können präzise erfaßt werden. Bei entsprechend geringem Volumen des Durchflußbereiches ist auch hier ein Einzelnachweis möglich.

30 Wird an die Meßlösung ein seine Polarität wechselndes elektrisches oder magnetisches Feld angelegt, so kann durch die hierdurch hervorgerufene Bewegung elektrisch geladener oder magnetischer (paramagnetischer oder diamagnetischer) Markerpartikel eine bessere Durchmischung der Analyten und der Markerpartikel erzielt werden. Insbesondere eignen sich hierzu paramagnetische Markerpartikel, da ein erheblich geringeres magnetisches Feld als bei diamagnetischen Markerpar-

35

5 tikeln benötigt wird. Durch eine derartige feldinduzierte Durchmischung kann die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit jeglichen markergestützten Nachweisverfahrens verbessert werden. Hierbei können zu den Markerpartikeln mit immobilisierten Molekülen auch solche kommen, die keine Moleküle tragen. Diese zusätzlichen Markerpartikel verstärken den Durchmischungseffekt. Diese Durchmischung des Meßmediums kann zusätzlich durch Einkoppelung von Ultraschall unterstützt werden.

10 Weiterhin können durch entsprechende elektrische oder magnetische Felder derartige Markerpartikel zu ihren Bindungsstellen auf der Unterlage aufgrund eines elektrophoretisch oder magnetisch verursachten Transportes bewegt werden oder nach beendeter Bindung der Überschluß an Markerpartikeln aus dem Umkreis der Unterlage entfernt werden. Durch diesen elektrophoretischen oder magnetfeldinduzierten Transport der Markerpartikel zu ihren Bindungsplätzen hin werden die in der Meßlösung vorhandenen Marker besser genutzt und die Sensitivität, die Nachweisgrenze und die Reproduzierbarkeit sowie die Genauigkeit der erfindungsgemäßen Verfahren wird stark verbessert. Durch 20 den auf die Bindung der Markerpartikel an ihre Bindungsstellen erfolgenden elektrophoretischen oder magnetfeldinduzierten Transport restlicher ungebundener Markerpartikel von den Bindungsstellen weg, wird deren Konzentration im Bereich der Unterlage und/oder der Elektroden stark verringert. Aufgrund der Sensitivität der Elektroden für Störungen, insbesondere in ihrem Nahfeld, beeinflussen die freien Markerpartikel die Messung nur noch unwesentlich. Ein besonderer Waschschrift, der nach dem Stand der Technik bei vielen analytischen Verfahren, insbesondere Immuno- 35 Assays, notwendig ist, kann auch von daher entfallen.

Haben die nachzuweisenden Moleküle im Meßverfahren und die molekülbeladenen Markerpartikel elektrische Ladungen mit unterschiedlichen Vorzeichen, so kann
5 beim Anlegen einer elektrischen Spannung der elektrophoretische Transport zunächst die geladenen Moleküle zu ihren Bindungsplätzen auf oder in der Umgebung der Elektroden transportieren. Nach erfolgter Bindung an
10 den Bindungsplätzen werden durch Umpolung des elektrischen Feldes die molekülbeladenen Markerpartikel zu den Bindungsplätzen auf oder im Umfeld der Elektroden gebracht. Dieses Verfahren ist besonders vorteilhaft bei der Verwendung von Sandwich-Format-Assays.

15 Der beschriebene, durch ein elektrisches oder magnetisches Feld induzierte gerichtete und der auf Durchmischung ausgerichtete wechselnde Transport elektrisch geladener bzw. magnetischer Partikel ist bei
20 allen markergestützten, in Meßlösungen ablaufenden Nachweisverfahren anwendbar.

Bei Anwendung inhomogener elektrischer Felder können
25 auch ungeladene, jedoch polare Markerpartikel durch das oben angegebene Verfahren gerichtet transportiert oder gemischt werden.

Entsprechend eines Ausführungsbeispiels der Erfindung
30 wird eine Elektrode verwendet, vor der eine Blende mit mindestens einer kleinen Öffnung angeordnet ist. Die Blende ist dabei der Meßlösung zugewandt und es wird über die Elektrode ein inhomogenes elektrisches Feld erzeugt, dessen Feldlinien durch die kleine Öffnung der Blende hindurchgehen. Die Markerpartikel
35 binden sich an bzw. in der Nähe der Oberfläche der Blende. Die mit dieser Ausführungsform erzielten Vor-

teile bestehen insbesondere darin, daß zur Erzeugung eines inhomogenen elektrischen Feldes keine Mikroelektrode mit einem Durchmesser im μm -Bereich und kleiner erzeugt werden muß, da die Blendöffnung ausschlaggebend für das elektrische Feld ist. Die Herstellung der Mikroelektroden ist zwar bekannt, aber sie erfordert einen aufwendigen technologischen Prozeß mit hohen Kosten. Bei der Verwendung einer Blende vor einer Makroelektrode sind die technologischen Anforderungen bei der Elektrodenherstellung nicht so hoch, so daß die erfindungsgemäße Vorrichtung mit geringen Kosten herzustellen ist. Es können somit Meßvorrichtungen mit Einzelelektroden oder Elektrodenarrays als Einmalartikel mit geringen Kosten hergestellt werden.

Ein weiterer Vorteil der Erfindung besteht darin, daß der Strom der durch die kleine Blendöffnung hindurch zur Gegenelektrode in der Meßlösung fließt, an der Elektrode nur eine sehr kleine Stromdichte verursacht. Im Vergleich zur Verwendung einer Mikroelektrode ist in diesem Falle die Stromdichte um das Verhältnis von Querschnittsfläche der Blendöffnung und Elektrodenfläche kleiner. Dies hat zur Folge, daß Änderungen des elektrischen Widerstandes hauptsächlich durch partikelinduzierte Feldstörungen verursacht werden und der Einfluß von elektrochemischen Elektrodenreaktionen ist weitgehend vernachlässigbar. Auf diese Weise können die Messungen genauer durchgeführt werden.

Entsprechend einem weiteren Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung wird die Messung des Nachweises der durch die Markerpartikel verursachten Störungen des elektrischen Feldes in der Meßlösung mit einem potentiometrischen Verfahren durchgeführt, wobei

das elektrische Feld an der Oberfläche einer Elektrode durch Potentialbildungsvorgänge an der Grenzfläche zwischen Meßlösung und Elektrode gebildet wird.

5 Die Vorteile dieser Ausführungsform bestehen insbesondere darin, daß gleichfalls Elektroden mit größerem Durchmesser bzw. größerer Fläche verwenden werden können. Dies ergibt sich aus der Tatsache, daß die
10 potentialbildenden Vorgänge an der Oberfläche einer potentiometrischen Elektrode in Abständen von dieser Elektrode auftreten, die in der gleichen Größenordnung liegen wie die Durchmesser von Markerpartikeln. Auf diese Weise können Markerpartikel im nm-Bereich bis in den μm Bereich verwendet werden.

15 Wichtig für die Anwendung bei einem potentiometrischen Meßverfahren ist, daß die Markerpartikel im flüssigen Meßmedium an ihrer Oberfläche eine deutlich andere elektrische Ladung und/oder Potentialdifferenz
20 aufweisen, als die ionenselektive Elektrode selbst. Dies ist eine günstige Voraussetzung bei einem potentiometrischen Nachweis für das Anbinden von Markerpartikeln.

25 Es ist sowohl bei dem amperometrischen als auch bei dem potentiometrischen Nachweisverfahren zusätzlich möglich, die Potentialverhältnisse an der Oberfläche der Markerpartikel dadurch zu beeinflussen, daß die
30 Markerpartikel mit Ionophoren dotiert sind, wie dies auch bei ionenselektiven Membranen der Fall ist. Hierbei sollten andere Ionophore verwendet werden, als in der ionenselektiven Membran, die zum Nachweis der gebundenen Markerpartikel dient. Ebenso ist es
35 möglich, Markerpartikel an der Oberfläche mit einer dünnen Metallschicht zu versehen.

Sowohl bei der amperometrischen als auch bei den potentiometrischen Nachweisverfahren kann der Nachweis von Analyten in einem Zweischnittprozeß erfolgen, der den Markerpartikeltransport und dann die Bindung an die Elektrode beinhaltet. Wie beschrieben, können hier elektrophoretischer und magnetischer Markerpartikeltransport verwendet werden.

Ausführungsbeispiele der Erfindung sind in der Zeichnung dargestellt und werden in der nachfolgenden Beschreibung näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 das elektrische Strömungsfeld in der Umgebung einer Mikroelektrode

- a) sphärische Mikroelektrode
- b) planare Mikroelektrode
- c) planare Mikroelektrode mit Markerpartikeln im Strömungsfeld

Fig. 2 Elektrophoretischer Markerpartikel-Transport
a+b) zur Mikroelektrode bzw.
c) von der Mikroelektrode weg

Fig. 3 Makroelektrode mit agglutinierten Markerpartikeln

Fig. 4 Durchflußzelle mit zwei Mikroelektroden,
a) ohne Markerpartikel
b) mit einem Markerpartikel und
c) mit zwei gebundenen Markerpartikeln

Fig. 5 Immunoassayformate
a) und b) Antigennachweis
c) und d) Antikörpernachweis
a) und c) Sandwich-Verfahren und

b) und d) kompetitive Verfahren

Fig. 6 Immunoassay nach Fig. 5 a) mit zusätzlicher
Membran

5

Fig. 7 Immunoassayformate im Durchflußverfahren
a) und b) Antigennachweis
c) und d) Antikörpernachweis
a) und c) Sandwich-Verfahren
b) und d) kompetitive Verfahren

10

Fig. 8 DNA-Sonde mit Antikörperwechselwirkung

Fig. 9 DNA-Sonde

15

Fig. 10 DNA-Sonde nach dem Sandwich-Prinzip

Fig. 11 Immuno-Assay-Array

20

Fig. 12 Querschnitt durch ein Immuno-Assay-Array

Fig. 13 Mikrocontainment-Assay

Fig. 14 Bio-Assay auf der Basis von Interdigital-
strukturen

25

Fig. 15 Modifiziertes Assay nach Fig. 14

Fig. 16 Modifiziertes Assay nach Fig. 14

30

Fig. 17 Meßschaltung für Assays nach Fig. 14 bis 16

Fig. 18 Immunoassay-Teststäbchen

35

Fig. 19 Bioassay für ganze Zellen

Fig. 20 weitere Ausführungsformen von Immunoassayfor-
mate

Fig. 21 weitere Ausführungsformen von Immunoassayfor-
mate

Fig. 22 weitere Ausführungsformen von Immunoassayfor-
mate

Fig. 23 schematisch eine Darstellung der Bindung im
magnetischen Wechselfeld,

Fig. 24 eine schematische Darstellung einer Elektrode
und einer Blende mit elektrischen Strömungs-
linien ohne gebundene Labelpartikel und mit
einem in der Nähe der Blendenöffnung gebunde-
nen Labelpartikel,

Fig. 25 eine schematische Darstellung einer Elektro-
den- und Blendenanordnung in Pipettenausfüh-
rung,

Fig. 26 eine Elektroden- und Blendenanordnung in
planarer Schichtbauweise,

Fig. 27 eine Elektroden- und Blendenanordnung in
planarer Schichtbauweise nach einer weiteren
Ausführungsform,

Fig. 28 eine Elektroden- und Blendenanordnung in
planarer Schichtbauweise mit zwei Elektroden
und entsprechenden Blenden,

Fig. 29 eine Elektroden- und Blendenanordnung in
planarer Schichtbauweise mit einer Gegenelek-

trode,

Fig. 30 eine weitere Ausführungsform einer Blende

5 Fig. 31 eine schematische Darstellung einer potentiometrischen Elektrode mit gebundenen Markerpartikeln,

10 Fig. 32 eine Realisierung von zwei potentiometrischen Elektroden auf einem planaren Träger für eine Differenzmessung,

Fig. 33 eine Elektrodenanordnung mit integriertem Fließkanal,

15 Fig. 34 eine Elektrodenanordnung mit integrierter Fließmatrix, und

20 Fig. 35 eine elektrische Schaltung mit einer potentiometrischen Elektrode sowie gegen- und Bezugselektroden.

Der Mechanismus des Bindungsnachweises ist in Figur 1 näher beschrieben.

25 In Fig. 1 a) ist die Umgebung einer Mikroelektrode gezeigt. Hierin ist 1 ein isolierender Träger, auf dem eine sphärische Mikroelektrode 2* angeordnet ist. Zwischen dieser Mikroelektrode 2* und einer nicht
30 dargestellten Gegenelektrode wird eine elektrische Spannung angelegt. Beide Elektroden werden von einem flüssigen Meßmedium 3 umspült. Von der unter Spannung stehenden Mikroelektrode 2* gehen elektrische Feldlinien 4 aus.

35

In Figur 1 b) und 1 c) ist der Mechanismus eines Bindungsnachweises gezeigt. Die planare Mikroelektrode 2 hat quadratische Form mit einer Kantenlänge von 3 µm. Die Elektrode ist mit Hilfe bekannter Dünnschichtverfahren auf einem isolierenden Träger 1, der aus Glas besteht, hergestellt worden. Das Material des Markerteilchens ist z.B. SiO₂, und der Durchmesser beträgt 2 µm.

Im wässrigen Meßmedium wird die spezifische Leitfähigkeit wie folgt beschrieben:

$$K = \sum_i z_i^2 \cdot F^2 \cdot \mu_i \cdot C_i \quad \text{Gleichung 1}$$

Hierin sind z_i die Ladungszahl, μ die Beweglichkeit und C die Konzentration der Ionen. F steht für die Faraday-Konstante.

Die Zusammenhänge zwischen elektrischer Stromdichte, elektrischer Feldstärke und Spannungsabfall zwischen Mikroelektrode und flüssigem Meßmedium stellen sich vereinfacht wie folgt dar:

An einer halbkugelförmigen Mikroelektrode ergibt sich ein Zusammenhang zwischen der Stromdichte J und dem elektrischen Strom I gemäß Gleichung 2.

$$J = \frac{I}{2\pi r^2} \quad \text{Gleichung 2}$$

Hierin ist r der Abstand vom Mittelpunkt der Mikroelektrode in das Meßmedium hinein. Für die elektrische Feldstärke E gilt mit der spezifischen Leitfähigkeit K des Meßmediums die Gleichung

$$E = \frac{1}{\kappa} \bullet J$$

Gleichung 3

Für den Spannungsabfall zwischen der Elektrodenoberfläche und dem flüssigen Meßmedium ergibt sich in Abhängigkeit vom Radius r

$$U_s = \int_{r_0}^r E dr = \frac{l}{2\pi\kappa} \left(\frac{1}{r_0} - \frac{1}{r} \right)$$

Gleichung 4

Für eine planare Mikroelektrode gemäß Fig. 1 b) folgt:

$$U_s' = U_s \bullet k \text{ mit } k \approx 0,6$$

Gleichung 5

Für den Abstand $r = 2r_0$ ergibt sich

$$U_s (r = 2r_0) = 0,5 U(r \rightarrow \infty)$$

Gleichung 6

Dies bedeutet, daß bereits in einem Abstand von einem Elektrodendurchmesser die Spannung um 50 % abgefallen ist.

Eine Störung des elektrischen Feldes in direkter Umgebung der Mikroelektrode 2* führt damit zu einer starken Veränderung des elektrischen Feldlinienverlaufes.

In Abb. 1 c) ist ein Markerpartikel (Labelpartikel) 5 gezeigt, das über eine Bindung 6 an eine Mikroelektrode 2 als Unterlage gebunden ist. Das durch das Markerpartikel 5 stark gestörte elektrische Strömungsfeld 4 wirkt sich in einer starken Änderung des meßbaren elektrischen Widerstandes zwischen der Mikroelektrode 2 und einer Gegenelektrode aus, die sich

ebenfalls im wäßrigen Meßmedium 3 befindet, aber nicht dargestellt ist.

Der elektrische Widerstand kann mit Hilfe von Gleich- oder Wechselspannungen mit Werten von einigen 10 mV bis wenigen Volt, vorzugsweise im 100mV-Bereich, und die elektrische Kapazität kann mit Hilfe von Wechselspannungen mit Frequenzen von wenigen Hz bis einigen MHz, vorzugsweise im kHz-Bereich, gemessen werden.

Wird das Binden von Markerpartikeln 5 im elektroden-nahen Raum durch Messung des elektrischen Widerstandes bzw. der elektrischen Kapazität zeitaufgelöst registriert, so kann eine quantitative Messung auf dynamischem Wege durch Auswertung der Signal-Zeit-Funktion erfolgen, da deren erste Ableitung ein Maß für die Analytkonzentration ist.

Die molekulare Wechselwirkung der Markerpartikel 5 mit der Unterlage wird weiterhin durch Transport von Markerpartikeln 5 in einem elektrischen Feld unterstützt, sofern die Markerpartikel 5 selbst elektrisch geladen sind. Dies kann wie folgt beschrieben werden.

Im elektrischen Feld E, das zwischen zwei Elektroden durch Anlegen einer elektrischen Spannung im wäßrigen Meßmedium erzeugt wird, wird auf ein elektrisch geladenes Markerpartikel 5 eine Kraft F ausgeübt:

$$F = z_i \cdot Q \cdot E$$

Gleichung 7

Hierin ist Q die Ladung der Ionen.

Aufgrund dieser Kraftwirkung bewegen sich die elektrisch geladenen Markerpartikel 5 mit einer Geschwindigkeit v im elektrischen Feld E:

$$v = \mu \cdot E$$

Gleichung 9

Die Geschwindigkeit der Marker Partikel (v) ist also proportional zur elektrischen Feldstärke E . Diese Proportionalität wird durch die Beweglichkeit μ beschrieben:

$$\mu = v/E$$

Gleichung 10

Die Beweglichkeit μ ist dabei abhängig von der Art des Meßmediums sowie der Art der Markerpartikel.

Dies bedeutet, daß sich die Markerpartikel aufgrund ihrer eigenen elektrischen Ladung im elektrischen Feld bewegen. Befinden sich darüber hinaus elektrisch geladene Moleküle an der Oberfläche der Markerpartikel, so bestimmt die Eigenladung des Markerpartikels auf jeden Fall dann die Richtung des feldinduzierten Transports, wenn der Betrag der Eigenladung größer ist als der Betrag der Ladungen der an der Oberfläche gebundenen Moleküle. Weist die Ladung der gebundenen Moleküle gleiche Polarität wie die Markerpartikel-Eigenladung auf, so wird der Transport durch Zunahme der Geschwindigkeit gestärkt. Bei entgegengesetzten Ladungen wird die Geschwindigkeit verringert.

In Fig. 2 ist der oben in der Theorie beschriebene elektrophoretische Transport von elektrisch geladenen Markerpartikeln 5 dargestellt. Aufgrund einer zwischen einer Mikroelektrode 2 und einer nicht dargestellten Gegenelektrode angelegten elektrischen Spannung von beispielsweise 500mV bewegen sich die Markerpartikel 5 in Richtung auf die Mikroelektrode zu, da elektrische Kräfte F_e auf die Partikel einwirken

(Fig. 2 a). Nach Annäherung (Fig. 2b) der Markerpartikel 5 an die Mikroelektrode 2 kann es zu einer bindenden Wechselwirkung 6 mit der als Unterlage ausgebildeten Elektrode 2 kommen (Fig. 2c). Nach Umkehrung des elektrischen Feldes wirken die elektrischen Kräfte F_e in entgegengesetzter Richtung, so daß die nicht gebundenen Markerpartikel 5 von der Mikroelektrode 2 wieder entfernt werden (Fig. 2c). Auf diese Weise erfolgt durch elektrophoretischen Transport ein Pseudo-Waschschritt. Für die Markerpartikel 5 kommt eine Auswahl von Materialien mit unterschiedlichen Ladungen in Frage, die sich für elektrophoretischen Transport eignen.

Ein Transport von paramagnetischen oder diamagnetischen Markerpartikeln kann auch in einem magnetischen Feld erfolgen, wobei im Falle diamagnetischer Markerpartikel das magnetische Feld inhomogen zu sein hat.

Das der Erfindung zugrundeliegende Wirkprinzip von Markerpartikel-Nachweis und -Transport kann als ein durch Markerpartikel (Labelpartikel) induzierter Feldeffekt (label induced field effect, LIFE) bezeichnet werden.

In Figur 3 ist ein Bio-Assay für den Nachweis höherer Analytkonzentrationen dargestellt. Damit das Binden 6 mehrerer Markerpartikel 5 mit Durchmessern von ca. 1 μm meßtechnisch nachgewiesen werden kann, werden auf einem isolierenden Träger 1 z.B. aus Glas größere Elektroden 2* verwendet, an deren Oberfläche es zu einer flächenhaften Belegung bis hin zu einer dreidimensionalen Agglutination von Markerpartikeln kommt. Die Elektrode hat z.B. eine rechteckige Form mit den Abmessungen von 10 x 50 μm .

Der Meßbereich für höhere Analytkonzentrationen kann Agglutinationsbereich genannt werden. Um eine Agglutination von Markerpartikeln zu vermeiden, die sich noch frei im Meßmedium bewegen, kann auch hier die Messung durch einen elektrophoretischen Marker-Transport zur Elektrode hin unterstützt werden.

Fig. 4 zeigt eine Durchflußzelle aus Kunststoff mit zwei gegenüberliegenden Mikroelektroden 2', 2'', die z.B. aus Platin bestehen und auf Trägermaterialien 7 aufgebracht sind. Der Fluß ϕ eines Meßmediums 3 bewegt Analytmoleküle und Markerpartikel 5 durch die Durchflußzelle. Der Abstand der Mikroelektroden 2', 2'' beträgt 50 μm und die Elektrodenfläche jeweils 5 $\mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$. In Fig. 4 a) ist die Durchflußzelle ohne Markerpartikel, in Fig. 4 b) mit einem Markerpartikel 5 und in Fig. 4 c) mit zwei untereinander gebundenen Markerpartikeln 5 dargestellt. Aufgrund des durch die Markerpartikel 5 gestörten elektrischen Strömungsfeldes kann durch Messung des elektrischen Widerstandes, bzw. der komplexen Admittanz, die Anwesenheit einer oder mehrerer Markerpartikel 5 zwischen den Mikroelektroden 2', 2'' nachgewiesen werden.

In Fig. 5 sind vier Immunoassay-Formate nach dem LIFE-Prinzip dargestellt.

Fig. 5a) zeigt ein Immunoassay zum Antigennachweis nach dem Sandwich-Prinzip. Auf einer Elektrode 2 sind Antikörper 9' immobilisiert. Von den Antigenen 8 tritt ein Antigen 8* in Wechselwirkung mit einem immobilisierten Antikörper 9' auf der Elektrode 2. Ein Antikörper 9⁽⁺⁾, der auf einem Markerpartikel 5 immobilisiert wurde, tritt in Wechselwirkung mit dem Antigen 8*, so daß sich ein Sandwich bildet. Die elek-

trodennahe Position des Markerpartikels 5 wird durch markerinduzierten Feldeffekt elektrisch bzw. elektrochemisch nachgewiesen.

5 Fig. 5 b) zeigt ein kompetitives Immunoassay-Format für den Antigennachweis. An den auf einer Mikroelektrode 2 immobilisierten Antikörpern 9' konkurrieren Antigene 8 mit auf den Markerpartikeln 5 immobilisierten Antigenen 8''. Im gezeigten Beispiel kommt es
10 zu einer Bindung zwischen einem immobilisierten Antigen 8''' eines Markerpartikels 5 und einem auf der Mikroelektrode 2 immobilisierten Antikörper (9'').

15 Fig. 5 c) zeigt entsprechend ein Immunoassay-Sandwichformat für den Antikörpernachweis und Fig. 5 d) entsprechend ein kompetitives Format für den Antikörpernachweis. Eine genaue Beschreibung wird zur Vermeidung von Wiederholungen der Erläuterungen zu Fig. 5 a) und 5 b) weggelassen.

20 Auch ist es möglich, die Messung - z.B. nach Figur 5a - mit Hilfe von zwei Elektroden durchzuführen, von denen auf einer Elektrode z.B. Antikörper immobilisiert sind und die andere Elektrode freibleibt. Werden nun die Widerstände oder Kapazitäten beider Elektroden gegen eine Referenzelektrode gemessen, so kann
25 die quantitative Erfassung der Analytkonzentration aus der Signaldifferenz beider Elektroden bestimmt werden. Auf diese Weise lassen sich Effekte eliminieren, die durch unspezifische Bindung von Molekülen
30 hervorgerufen werden.

In einem weiteren Ausführungsbeispiel zeigt die Fig. 6 in Anlehnung an Fig. 5 a) ein Immunoassay-Format vom Sandwich-Typ. Zusätzlich zur Darstellung in Fig. 5 a) ist hier eine Membran 10 über einer Mikroelek-
35

trode 2 angeordnet. Diese Membran besteht z.B. aus Nitrozellulose oder aus Nylon. In der Membran 10 sind Markerpartikel 5 mit immobilisierten Antikörpern 9'' lokalisiert und beweglich. Der Nachweis von Antigenen 8 kann nun auf einfache Weise dadurch erfolgen, daß ein flüssiges Meßmedium 3 auf die Oberfläche der Membran 10 aufgebracht wird. Diese Membran kann als funktionelle Schicht ausgebildet sein und Funktionen übernehmen, die z.B. aus dem Bereich der Immunfiltration bekannt sind. Das Medium erfährt in dieser Membran eine Filtration und/oder eine Konditionierung. Der Nachweis der Sandwichbildung erfolgt wie im Beispiel nach Fig. 5 a) beschrieben.

Es ist aber auch möglich, die Elektroden mit Membranen zu bedecken, die von Mikropartikeln nicht durchdrungen werden können. Hierbei werden die molekularen Bindungspartner nicht auf der Elektrode selbst, sondern auf der freien Membranoberfläche immobilisiert, an der sie auch in Wechselwirkung mit dem molaren Bindungspartner der Markerpartikel treten.

In Fig. 7 sind die verschiedenen Immunoassay-Formate für eine Durchflußmeßzelle mit Mikroelektroden 2', 2'' gezeigt. Fig. 7 a) zeigt die Immobilisierung von Antikörpern 9'' auf Markerpartikeln 5, an die für die Antikörper 9'' spezifische Antigene 8 gebunden sind. Über Antigene 8* kommt es auch zur Agglutination zweier Markerpartikel 5. In Fig. 7 b) konkurrieren Antigene 8 mit einem Markerpartikel 5, das mit Antigenen 8'' versehen ist, um die Bindungsstellen auf einem Markerpartikel 5, das mit Antikörpern 9'' versehen ist. In Fig. 7 c) und Fig. 7 d) sind die entsprechenden Formate für den Nachweis von Antikörpern dargestellt. Die elektrische Messung erfolgt gemäß dem Beispiel nach Fig. 4.

In Fig. 8 ist eine DNA-Sonde dargestellt. Fig. 8 a) zeigt ein Markerpartikel 5 und eine DNA 11 in einer Meßlösung. Auf einem Markerpartikel 5 wird die DNA 11 immobilisiert (Fig. 8 b). Anschließend kommt es zu einer Hybridisierung von DNA 11' und RNA 12 aus dem Meßmedium (Fig. 8 c, d). Im nächsten Schritt (Fig. 8e) kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen dem DNA-RNA-Hybrid und einem immobilisierten Antikörper 9', so daß der Markerpartikel 5 mikroelektrodennah lokalisiert und elektrisch nachweisbar ist.

In Fig. 9 ist eine DNA-Sonde ohne immobilisierte Antikörper dargestellt. Ein DNA-Molekül 11 wird auf einem Markerpartikel 5 immobilisiert (Fig. 9 a). Anschließend an die Bindung der DNA 11 an das Markerpartikel 5 erfolgt eine Hybridisierung mit einem auf der Mikroelektrode 2 immobilisierten RNA-Strang 12' (Fig. 9 b), und es kommt zu einer phasengrenznahen Lokalisierung des Markerpartikels 5 (Fig. 9 c). In diesem Beispiel können RNA- gegen DNA-Moleküle ausgetauscht werden und umgekehrt.

Die Fig. 10 zeigt ein DNA-Assay vom Sandwich-Typ. Auf einer Mikroelektrode ist ein DNA-Sonden-Molekül 13 immobilisiert (Fig. 10A). Ein DNA-Molekül 11 aus dem Meßmedium tritt in Wechselwirkung mit dem Sondenmolekül 13 (Fig. 10 b). Nach Hybridisierung der Moleküle 13 und 11 zu einem Hybrid (11*, 13*) kommt es zu einer Wechselwirkung mit einem Reporter-Sonden-Molekül 14, das auf einem Markerpartikel 5 immobilisiert ist (Fig. 10 c). Durch diese Hybridisierung kommt es zu einer mikroelektrodennahen Lokalisierung des Markerpartikels 5 (Fig. 10d). Die meßtechnische Erfassung erfolgt wie in den vorangegangenen Beispielen be-

schrieben. Auf diese Weise lassen sich z.B. DNA-Sonden-Arrays zu Sequenzierung aufbauen.

In der Fig. 11 ist ein Ausschnitt eines Mikroelektroden-Arrays dargestellt. Auf einem isolierenden Träger 1 ist eine Vielzahl von Mikroelektroden 2 realisiert. In der Fig. 11 sind drei Mikroelektroden dargestellt. Auf den Mikroelektroden sind Antikörper unterschiedlichen Typs 9', 9°, 9^v immobilisiert (Fig. 11 a).

Zu den Antikörpern 9' passen Antigene 8. Zu den Antikörpern 9° passen Antigene 8°. Treten die genannten Antigene 8, 8° mit den Antikörpern 9', 9° in Wechselwirkung, die auf den verschiedenen Mikroelektroden immobilisiert sind, so kann sich durch Anlagerung entsprechender Antikörper, die auf Markerpartikeln immobilisiert sind, jeweils ein Sandwich bilden (Fig. 11 b). Die Sandwichbildung kann dadurch unterstützt werden, daß bei Verwendung geladene Markerpartikel diese durch Anlegen einer elektrischen Spannung zwischen den Mikroelektroden 2 und einer nicht dargestellten äußeren Referenzelektrode elektrophoretisch in Richtung der Mikroelektroden bewegt werden (Fig. 11 a) und b). Nach Sandwichbildung (Fig. 11 b) wird der elektrophoretische Transport durch Umpolung der elektrischen Spannung und der Kraft F umgekehrt, so daß die nicht gebundenen Markerpartikel von den Mikroelektroden weg bewegt werden (Fig. 11 c). Auch dies ist ein Pseudo-Waschschritt. Die Erfassung der im Sandwich gebundenen Markerpartikel erfolgt auf elektrische Weise, wie in den vorangegangenen Beispielen beschrieben. Der elektrophoretische Markerpartikel-Transport kann auch durch einen magnetisch induzierten Transport paramagnetischer Markerpartikel ersetzt werden.

Auf gleiche Weise kann mit solchen Arrays ein DNA-Chip-Assay realisiert werden, das für eine Sequenzierung durch Hybridisierung verwendet werden kann. Hierbei werden anstelle der Antikörper bzw. Antigene DNA-Sonden eingesetzt, wie dies in den Figuren 8 bis 10 dargestellt ist.

In Fig. 12 ist ein Ausschnitt aus einem planaren Mikroelektroden-Array dargestellt. Ein Träger 1 besteht aus Glas. Eine Mikroelektrode 2, eine Leiterbahn 17 sowie ein elektrischer Kontakt 15 bestehen aus Platin und wurden durch ein gängiges Dünnschichtverfahren hergestellt. Die für ein solches Bio-Assay verwendeten Medien (Markerpartikel, Antikörper usw.) sowie das Meßmedium können auf die Mikroelektrode aufgebracht werden.

Ein weiteres Ausführungsbeispiel ist in Fig. 13 dargestellt. Als Ausschnitt aus einem größeren Array ist eine spiegelsymmetrische und daher nur einseitig mit Bezugszeichen versehene Struktur mit zwei Mikroelektroden 2[#] dargestellt. Ein Träger 1 für die Mikroelektroden 2[#] besteht aus einem dreidimensional strukturierbaren Material. Hierfür läßt sich insbesondere Silizium einsetzen, das durch bekannte anisotrope Ätzverfahren dreidimensional strukturiert wird. An der Oberfläche ist das Silizium elektrisch isoliert. Hierfür werden SiO₂-Schichten an der Siliziumoberfläche durch thermische Oxydation erzeugt.

Zusätzlich kann eine Si₃N₄-Schicht über der SiO₂-Schicht durch CVD-Verfahren abgeschieden werden. Mit Hilfe eingeführter Dünnschichtverfahren kann ein Metallfilm auf der Trägeroberfläche abgeschieden und strukturiert werden. Dieser Metallfilm besteht aus Platin. Nach der Strukturierung ergibt sich eine Mi-

kroelektrode 2[#], die über eine Leiterbahn 17 mit einem elektrischen Anschlußkontakt 15 verbunden ist. Die Leiterbahn 17 ist mit einer elektrischen Isolationsschicht 16 bedeckt, die z.B. aus einem Polymermaterial besteht. Die Mikroelektrode 2[#] befindet sich in einer pyramidenartigen Vertiefung, die als Containment 18 bezeichnet werden kann. Die Containments 18 dienen einerseits zur Aufnahme des zu immobilisierenden Materials, andererseits dienen sie zur Aufnahme der Probe. Der Betrieb eines solchen Arrays kann auf gleiche Weise erfolgen wie im Beispiel nach Fig. 11 und 12.

In Fig. 14 ist eine einfache Struktur für eine Vorrichtung nach der Erfindung als Bio-Assay abgebildet. Auf einem Träger 1 sind zwei Interdigitalstrukturen 19 und 19' realisiert (Fig. 14 a). Die gezeigten Fingerstrukturen sind nicht maßstäblich dargestellt. Die Fingerbreiten und die Abstände zwischen den Fingern betragen typisch wenige μm . Damit ist die Bedingung einer kleinen Elektrodenoberfläche für den Nachweis von nur wenigen gebundenen Markerpartikeln gegeben. Die Interdigitalstrukturen 19, 19', elektrische Leiterbahnen 17, 17', 17', 17' sowie elektrische Anschlußkontakte 15, 15', 15', 15' sind z.B. mit Hilfe bekannter Dünnschichtverfahren aus Platin hergestellt. Dieser Träger wird mit einer Abdeckung 20 versehen (Fig. 14 b). Die Montage der Abdeckung 20 erfolgt z.B. durch Kleben. Sie kann auch im Siebdruckverfahren aufgebracht werden. Durch in der Abdeckung vorgesehene Durchbrüche 21, 21' kann die Probe mit den Interdigitalstrukturen in Wechselwirkung treten. Zuvor wurden auf der Fläche einer der Interdigitalstrukturen Antikörper immobilisiert. Durch Eintauchen der Struktur nach Fig. 14 b) in eine Meßlösung mit Antigenen zu den immobilisierten Antikör-

pern als Analyten kann ein Immunoassay vom Sandwich-
typ durchgeführt werden, wie es in Fig. 5 a) be-
schrieben ist. Hierfür sind auf der Fläche 22 Mar-
kerpartikel mit immobilisierten Antikörpern schwach
5 immobilisiert. Nachdem die Struktur nach Fig. 14 b)
bis zum oberen Rand der Fläche 22 in das Meßmedium
eingetaucht ist, können sich die auf der Fläche 22
befindlichen Markerpartikel im Meßmedium lösen. Auf
diese Weise kann eine Sandwichbildung erfolgen, wie
10 sie in Fig. 5 a) beschrieben ist.

Zusätzlich ist es möglich, durch Anlegen einer elek-
trischen Spannung zwischen den Interdigitalstrukturen
und einer äußeren Referenzelektrode einen elektropho-
15 retischen Transport geladener Markerpartikel durch-
zuführen. Eine elektrische Schaltung hierfür ist in
Fig. 17 gezeigt, die weiter unten beschrieben wird.

Die Messung kann an beiden Interdigitalstrukturen
20 vorgenommen werden. Da nur auf einer der beiden
Strukturen Antikörper immobilisiert sind, kommt es
auch nur hier zur Sandwich-Bildung. Durch eine Aus-
wertung der Differenz der Signale von den beiden In-
terdigitalstrukturen kann der Einfluß nicht spezi-
25 fisch bindender Moleküle eliminiert werden.

Ein gegenüber Fig. 14 modifiziertes Ausführungsbei-
spiel ist in Fig. 15 dargestellt. Hier ist die Ab-
deckung 20 mit den Durchbrüchen 21, 21' (Fig. 15 a)
30 mit einer zusätzlichen Membran 23 (z.B. einer Dialy-
semembran) abgedeckt (Fig. 15 b). Die für das Bio-As-
say verwendeten Markerpartikel mit den immobilisier-
ten Molekülen sind vor dem Aufbringen der Membran 23
in löslicher Form in einen der Durchbrüche 21, 21'
35 eingebracht worden. Die Sensorkonfiguration nach Fig.
15 b) wird mit ihrem unteren Ende in das Meßmedium

eingetaucht, so daß das Meßmedium durch die dünne Schicht 23 in den Bereich der Durchbrüche 21, 21' eindringen kann. Die Messung erfolgt wie im Beispiel nach Fig. 14 beschrieben.

5

In einem weiteren Ausführungsbeispiel ist es möglich, den elektrophoretischen Transport der Markerpartikel durch einen magnetischen Transport zu ersetzen. Dies ist in der Fig. 16 vereinfacht dargestellt, bei der eine Assaystruktur nach Abb. 14 mit einem Magneten 24 versehen wird. Zur Unterstützung der Sandwichbildung wird ein Magnetfeld so ausgebildet, daß die paramagnetischen Markerpartikel in den Bereich der Interdigitalstrukturen 19, 19' gezogen werden. Dies ist z.B. mit Hilfe des kleinen Magneten 24 möglich. Nach Sandwichbildung wird der Magnet 24 auf der gegenüberliegenden Seite (in der Fig. 16 oberhalb der Assaystruktur) angeordnet, so daß die Markerpartikel von den Interdigitalstrukturen 19, 19' weg bewegt werden und es zu einem Pseudowaschschritt kommt.

10

15

20

Der kleine Magnet 24 kann auch durch einen Elektromagneten ersetzt werden.

25

30

35

In Figur 17 ist eine Meßschaltung für Vorrichtungen (Assays) nach den Figuren 14 bis 16 gezeigt. Eine Spannungsquelle 29 erzeugt ein Gleichspannungs- oder ein Wechselspannungssignal im mV-Bereich, vorzugsweise in der Höhe einiger 100 mV. Dieses Signal wird über Anschlüsse 34 und 35 mit Anschlüssen 15 und 15' bzw. 15' und 15'' der Interdigitalstrukturen nach Figuren 14, 15 oder 16 verbunden. Der sich über die Meßlösung einstellende Gleich- bzw. Wechselstrom wird mit einem Strommesser 30 registriert. Aus den Spannungs-Strom-Daten wird der elektrische Leitwert als ein Maß für die Analytkonzentration des Meßmediums in

der Umgebung der gegebenenfalls mit Markerpartikeln belegten Elektroden der Interdigitalstruktur gemessen.

5 Für den elektrophoretischen Markerpartikel-Transport kann von einer Gleichspannungsquelle 33 über Widerstände 31 und 32 an die Anschlüsse 34 und 35 eine Gleichspannung im Bereich von einigen 100mV gegen eine Gegenelektrode angelegt werden. Die Gegenelektrode
10 kann sich in einer größeren Entfernung von den Interdigitalstrukturen im Meßmedium befinden. Beispielsweise besteht diese Gegenelektrode aus einem chloridisierten Silberfilm, wie dies dem Stand der Technik entspricht. Die Werte der Widerstände 31, 32
15 liegen im k Ω - bzw. im M Ω -Bereich (z.B. bei 100 k Ω).

In Figur 18 ist ein Immunoassay-Teststäbchen in stark vereinfachter Form dargestellt. Auf einem Träger 1 (Fig. 18 a) befindet sich eine Immobilisierungsschicht 25 aus einem Material, an dessen Oberfläche Antigene bei Kontakt immobilisiert werden. Diese Schicht besteht aus PVA und überdeckt eine Interdigital-Doppelstruktur (nicht dargestellt), wie diese aus den Figuren 14 bis 16 bekannt sind. Die elektrischen Anschlüsse (nicht dargestellt) befinden sich auf einer Anschlußfläche 26. Wird die Anordnung nach Figur 18a in ein Gefäß 27 mit einem Meßmedium 3 gebracht, das Antigene 8 enthält, werden auf der Immobilisierungsfläche 25 Antigene immobilisiert (Fig. 18b1).
20 Gleiches kann beim Einbringen der Anordnung nach Figur 18a in ein Gewebe (z.B. Fleisch ...) oder ein gelartiges Meßmedium geschehen (Fig. 18 b2).

35 Anschließend wird die Anordnung in Kontakt mit einem flüssigen Medium gebracht, das Markerpartikel mit immobilisierten Antikörpern enthält (Fig. 18c). Nach

dem Zustandekommen der Antikörper/Antigen-Wechselwirkung mit der elektrodennahen Lokalisierung der Markerpartikel (im Bereich der Interdigitalstrukturen unter der Schicht 25) kann die Messung so erfolgen, wie in den vorangegangenen Beispielen dargestellt.

Ein weiteres Beispiel eines Bioassays ist in Fig. 19 gezeigt. Mit einem solchen Assay lassen sich ganze Zellen 40 nachweisen. Die Anordnungen gemäß Fig. 19 a) und b) entsprechen einem Immunoassay-Format gemäß Fig. 5 a). Gegenüber dem Immunoassay sind die Antigene ersetzt durch Zellen 40, die an ihrer Oberfläche Strukturen mit der Eigenschaft von Antigenen 8^a tragen. Fig. 19 a) zeigt ein Bioassay mit kleinen Zellen (z.B. Protozyten mit Durchmessern im Bereich von 0,3 und 2,5 µm). Die Fig. 19 b) stellt ein Assay mit z.B. Euzyten mit Durchmessern zwischen 2 und 20 µm dar.

Die in den vorangegangenen Ausführungsbeispielen verwendeten Markerpartikel können zum Beispiel aus Mikrosphären aus SiO₂, Latex, diamagnetischen, paramagnetischen und anderen Materialien mit Durchmessern zwischen 15nm und 25mm bestehen. Darüber hinaus können auch Dendrimere verwendet werden.

Neben Markerpartikeln aus elektrisch isolierenden Materialien lassen sich auch Markerpartikel einsetzen, die aus metallischem Material hergestellt sind. Solche elektrisch leitfähigen Markerpartikel lassen sich auch realisieren, indem elektrisch isolierende Markerpartikel (z.B. Mikrosphären) mit einer dünnen Metallschicht bedampft werden.

Die Fig. 20 zeigt als weiteres Ausführungsbeispiel ein anderes Immunoassayformat. Auf dem Träger 1 befindet sich wie in allen vorangegangenen Ausführungs-

beispielen eine Mikroelektrode 2, auf der Antikörper 9 immobilisiert sind. Wie in der Fig. 2a gezeigt, befinden sich im Halbraum oberhalb der Mikroelektrode Antigene 8 und 8' sowie Markerpartikel 5. Diese Markerpartikel sind mit einem elektroaktiven Stoff A (z.B. Ascorbinsäure) beladen. Die Antigene 8, 8', die zu den Antikörpern 9 auf der Elektrode 2 komplementär sind, können in bindende Wechselwirkung treten. Tragen die Antigene eine elektrische Ladung, so ist es zusätzlich möglich, diese Antigene mit Hilfe eines elektrischen Feldes F_e zur Elektrode zu befördern (Fig. 20a + b). Die Markerpartikel 5 mit einem magnetischen bzw. paramagnetischen Kern können nun mit Hilfe eines magnetischen Feldes F_m auf die Elektrode 2 hin bewegt werden (Fig. 20c). Dabei können die Antikörper 9 mit den Antigenen 8 in bindende Wechselwirkung treten, die bereits an die Antikörper angebunden haben, die auf der Elektrode 2 immobilisiert sind. Nicht gebundene Markerpartikel können mit Hilfe eines in der Richtung umgedrehten magnetischen Feldes F_m von der Mikroelektrode 2 entfernt werden. Die Markerpartikel 5 sind mit dem elektroaktiven Stoff A beladen, der durch Diffusion aus der Markerpartikeloberfläche austreten kann. Somit wird das elektrodennahe Anbinden von Markerpartikeln dadurch registriert, daß ein Umsatz des elektroaktiven Stoffes A an der Elektrode 2 erfolgt, bei dem ein elektrischer Strom in Form von Elektronen e fließt. Hierzu wird zwischen der Mikroelektrode 2 und einer Gegenelektrode (nicht dargestellt) eine elektrische Spannung von einigen 100 mV angelegt. Alternativ zur Bewegung der Markerpartikel mit Hilfe eines magnetischen Feldes kann ein elektrisches Feld zum elektrophoretischen Transport eingesetzt werden. Dies ist in den vorangegangenen Ausführungsbeispielen bereits gezeigt worden.

Ein weiteres Ausführungsbeispiel ist in Fig. 21 gezeigt. Hier kommt es wie im Beispiel nach Fig. 20 zu einer bindenden Wechselwirkung von Antigenen 8' mit Antikörpern 9, die auf der Elektrode 2 immobilisiert sind. Dies kann auch wieder durch ein elektrisches Feld F_e unterstützt werden.

In diesem Ausführungsbeispiel sind an der Oberfläche der Markerpartikel 5 nicht nur Antikörper 9' sondern auch Enzyme E immobilisiert. Im Meßmedium oberhalb der Elektrode 2 befindet sich ein Substrat S (z.B. Glukose) das mit Hilfe des Enzyms (z.B. Glukoseoxydase) enzymatisch umgesetzt werden kann. Kommt es nun zu einem Anbinden der Markerpartikel an die Oberfläche der Elektrode 2, so führen die an der Markerpartikeloberfläche immobilisierten Enzyme (E) zu einem Umsatz des Substrates (S). Das dabei entstehende Produkt (P) (z.B. H_2O_2) kann elektrochemisch an der Elektrodenoberfläche 2 umgesetzt werden.

Überschüssige Markerpartikel können durch Umkehrung des magnetischen Feldes F_m von der Elektrodenoberfläche entfernt werden.

Der enzymatisch katalysierte Stoffumsatz an der Elektrode 2 erfolgt in gleicher Weise wie bei bekannten elektrochemischen Glukosesensoren. Hierfür wird zwischen der Elektrode 2 und einer Gegenelektrode eine elektrische Spannung von einigen 100 mV (vorzugsweise 600 mV) angelegt.

Ein weiteres Ausführungsbeispiel ist in Fig. 22 gezeigt. Hier kann es ebenso wie in den vorangegangenen Ausführungsbeispielen zu einer bindenden Wechselwirkung zwischen Antigenen 8, 8' und den auf der Elek-

trode immobilisierten Antikörpern 9 kommen. Mit Hilfe eines magnetischen Feldes können nun Markerpartikel in die Nähe der Elektrode transportiert werden. Die Markerpartikel 5 tragen an ihrer Oberfläche immobilisierte Antikörper 9 und immobilisierte Enzyme (E) (Fig. 22b). Nachdem es zu einer bindenden Wechselwirkung zwischen den Markerpartikeln 5 und der Elektrode 2 gekommen ist, kann durch Umkehrung des magnetischen Feldes der Überschuß an Markerpartikeln 5 (nicht dargestellt) von der Elektrode entfernt werden. Anschließend wird mit Hilfe eines magnetischen Feldes F_m eine zweite Sorte von Markerpartikeln 5' auf die Elektrode 2 zubewegt. Diese Markerpartikel 5' sind mit einem Substrat S (z.B. Glukose) beladen. Befinden sich die Markerpartikel 5' in der Nähe der Elektrode 2, so führt ein ausdiffundierendes Substrat S zu einer Wechselwirkung mit den auf den Markerpartikeln 5 immobilisierten Enzymen E. Das dabei entstehende Produkt P wird wie im vorangegangenen Ausführungsbeispiel dargestellt an der Elektrode 2 elektrochemisch umgesetzt (Fig. 22d).

Anstelle von Markerpartikeln mit immobilisierten Enzymen (Fig. 21 u. Fig. 22) können auch Markerpartikel verwendet werden, die mit Enzymen beladen sind. Aus diesen Markerpartikeln können die Enzyme auf gleiche Weise freigesetzt werden, wie dies für die elektroaktive Substanz im Beispiel nach Fig. 20 beschrieben wurde.

In analoger Weise lassen sich außer den oben dargestellten Immunoassayformaten auch DAN-Sonden und andere Bioassays realisieren. Hierbei werden lediglich die Immunkomplexe durch andere Bindungen ersetzt.

35

Auch bei den Varianten nach Fig. 20 - 22 lassen sich Assays mit einer extrem geringen Nachweisgrenze realisieren, wenn die Fläche der Mikroelektrode nicht sehr viel größer ist als die projizierte Querschnittsfläche der Markerpartikel. Somit ist auch hier ein Einzelbindungsnachweis möglich, d.h. das Anbinden eines Markerpartikels auf einer Mikroelektrode ist nachweisbar.

Bei diesen Varianten beruht der Nachweis darauf, daß die Markerpartikel in ihrer unmittelbaren Umgebung eine Erhöhung einer Stoffkonzentration verursachen. Dies erfolgt durch Freisetzung bzw. durch enzymatische Substratumsetzung an der Partikeloberfläche.

Hierbei geht es nicht, wie z.B. bei anderen Biosensoren um ein meßbares Signal, das von der Substratkonzentration abhängig ist. Vielmehr ist das meßbare Signal von der Anzahl der mikroelektrodennah lokalisierten Markerpartikel bestimmt.

Ein anderes Ausführungsbeispiel zeigt Fig. 23. Auf einem Träger 1 ist eine Mikroelektrode 2 angebracht. Kommt es wie oben beschrieben zu einer Bindung 6 zwischen Markerpartikeln 5 und der Elektrode 2, so sind die Markerpartikel mikroelektrodennah lokalisiert. Handelt es sich um ferromagnetische Markerpartikel mit einem eigenen magnetischen Feld, so kann die elektrodennahe Lokalisierung der Markerpartikel 5 mit Hilfe eines Sensors 37 nachgewiesen werden, der die Stärke des magnetischen Feldes mißt.

Es ist ebenso möglich, Markerpartikel mit paramagnetischem Kern zu verwenden. Wird nun oberhalb des Trägers 1 ein magnetisches Wechselfeld 4 erzeugt, so kann die durch die Markerpartikel verursachte Änderung der magnetischen Feldstärke mit Hilfe des Sen-

sors 37 detektiert werden. die Frequenz des magnetischen Wechselfeldes kann zwischen einigen Hertz und einigen MHz liegen.

5 Bei der Verwendung von Markerpartikeln mit ferromagnetischem oder paramagnetischem Kern ist es wichtig, daß sich die Permeabilitätszahl des Partikels bzw. des Partikelkerns von der Permeabilitätszahl des flüssigen Meßmediums der Unterlage und bei einer
10 Durchflußmessung der Durchflußmeßkammer entsprechend Fig. 4 unterscheidet.

In diesem Ausführungsbeispiel kann der elektrophoretische Transport von bindenden molekularen Partnern
15 zur Elektrode 2 hin erfolgen, wie dies in den vorangegangenen Ausführungsbeispielen beschrieben wurde. Ebenso ist es möglich, den Transport der Markerpartikel durch elektrophoretischen Effekt zu bewirken.

20 In den Figuren 24 bis 30 ist eine Meßanordnung für den Nachweis von Markerpartikeln in Meßlösungen dargestellt, die mindestens eine Elektrode mit davor angeordneter Blende zeigen, während in den Figuren 31 bis 35 eine Meßanordnung zum Nachweis von Markerpartikeln in Meßlösungen mit potentiometrischen Elektroden
25 dargestellt sind.

Die obigen Ausführungen gelten auch für diese Ausführungsbeispiele, wobei die Mikroelektroden durch die
30 im folgenden beschriebenen Elektroden ersetzt werden können.

Die Fig. 24a) zeigt eine Makroelektrode 2, die sich von einer Blende 101 aus elektrisch nichtleitendem
35 Material mit einer Blendenöffnung 105 befindet. Der Raum zwischen der Blende 101 und der Elektrode 2 ist

mit einem Innenelektrolyten 103 ausgefüllt, der über die Blendenöffnung 105 mit dem Meßmedium 3 (Elektrolyt) in Kontakt ist. Dabei kann der Innenelektrolyt beispielsweise als Gel ausgebildet sein, wobei es möglich ist, daß es sich bis in die Blendenöffnung 105 hinein erstreckt. In großer Entfernung von der Blende 101 befindet sich eine Gegenelektrode (in der Figur nicht dargestellt) im Meßmedium. An die Elektroden wird eine elektrische Gleich- und/oder Wechselspannung angelegt, wodurch ein elektrisches Feld zwischen den Elektroden erzeugt wird. Die von der Elektrode 2 ausgehenden elektrischen Feldlinien 4'' konzentrieren sich im Bereich der Blendenöffnung 105. Im Meßmedium 3 beschreiben die elektrischen Feldlinien 4''' ein sich radial ausbreitendes elektrisches Feld.

Fig. 24b) zeigt die Elektroden- und Blendenkonfiguration mit einem Label- (Marker-)partikel 5, das mit Hilfe einer Bindung 6 an die Blende 101 gebunden ist. Sind die molekularen Bindungspartner in der Nähe der Blendenöffnung 105 lokalisiert, so erfolgt die Bindung des Labelpartikels 5 in unmittelbarer Nähe der Blendenöffnung 105. Der oben beschriebene LIFE-Effekt (Label Induced Field Effect), d.h. ein durch Markenpartikel induzierter Feldeffekt, führt zu einer Störung des elektrischen Feldes und der elektrischen Feldlinien 4''' im Meßmedium 3. Dies kann, wie beschrieben, elektrisch nachgewiesen werden.

Die Größe der Blendenöffnung 105 liegt im Bereich zwischen 0,5 μm und 100 μm , vorzugsweise im Bereich um 1 μm . Der Abstand zwischen der Blende 101 und der Elektrode 2 kann beliebig gewählt werden, wenn er deutlich größer ist als der Durchmesser der Blendenöffnung. Beispielsweise beträgt dieser Blendenabstand

1 mm. Der Durchmesser der Markerpartikel liegt zwischen 0,5 μm und 100 μm , vorzugsweise im Bereich um 1 μm .

5 In Fig. 25 ist eine Elektroden- und Blendenkonfiguration in Pipettenteknik dargestellt. Eine Mikropipette 119, die zum Beispiel aus Glas besteht, besitzt an ihrer Spitze eine Blende 101' mit einer Blendenöffnung 105. Die Pipette ist mit einem Innenelektrolyten
10 103 gefüllt, in den eine Elektrode 2 hineinragt. Die Elektrode 2 ist mit Hilfe einer elektrischen Zuleitung 110 und einem elektrischen Anschluß 111 an eine Meßelektronik anschließbar. Partikel 5, die durch Bindungen 6 in der Nähe der Blendenöffnung 105 lokalisiert sind, führen, wie im Beispiel nach Fig. 24
15 gezeigt, zu einer Störung des elektrischen Feldes und sind damit elektrisch nachweisbar.

20 In Fig. 26 ist eine Elektroden- und Blendenkonfiguration nach Fig. 24 in planarer Bauweise dargestellt.

Auf einem Träger 112 befindet sich eine dünne Elektrodenschicht 2'. Der Träger 112 kann zum Beispiel aus einer Kunststoffolie bestehen. Hierfür sind alle
25 Materialien einsetzbar, die einen hohen elektrischen Widerstand aufweisen. Die Elektrodenschicht 2' kann zum Beispiel aus einem Edelmetall (Gold, Platin, Silber AGCl usw.) durch bekannte Dünnschichtverfahren aufgebracht werden. Ebenso ist es möglich, die Elektrodenschicht 2' mit Hilfe elektrisch leitfähiger Pa-
30 sten nach dem Siebdruckverfahren aufzubringen. Auf dem Träger 112 ist ein Abstandshalter 113 zum Beispiel durch Klebetechnik oder durch Heißlaminieren aufgebracht. Der Abstandshalter 113 besitzt einen
35 Durchbruch 115 für die elektrische Kontaktierung der dünnen Elektrodenschicht 2' sowie ein Kompartiment

114 für den Innenelektrolyten. Der Abstandshalter kann aus dem gleichen Material hergestellt sein wie der Träger 112. Auf dem Abstandshalter 113 ist eine Blendenfolie 101' durch Klebe- und Heißlaminiertechnik aufgebracht. Die Blendenfolie 101' weist ein oder mehrere Blendenöffnungen 105' auf.

Das Einbringen des Innenelektrolyts in sein Kompartiment 114 kann zum Beispiel nach dem Verfahren der Vakuumbefüllung erfolgen. Hierfür wird die Konfiguration nach Fig. 26b) in einen Elektrolyten eingebracht und oberhalb des Elektrolyten ein Vakuum erzeugt. Dadurch wird das Kompartiment 14 entlüftet und der Innenelektrolyt dringt ein.

Die Blendenöffnungen 105' auf der Blendenfolie 101' können zum Beispiel mit Hilfe eines Lasers erzeugt werden. Auch ist es möglich, eine perforierte Blendenfolie nach dem bekannten LIGA-Verfahren herzustellen. Ebenso ist es möglich, die Blendenfolie 101' in Form eines Ion-Track-Filters zu realisieren. Bei solchen Ion-Track-Filtern werden mikroskopische Öffnungen im μm -Bereich und im Sub- μm -Bereich erzeugt. Weiterhin lassen sich Kapillarporen-Membranfilter verwenden, die Poren im μm - und im Sub- μm -Bereich aufweisen. Solche Kapillarporen-Membranfilter sind kommerziell erhältlich und bestehen beispielsweise aus den Materialien Polykarbonat, Polyester, Acrylpolymer, PP.

Wichtig bei der Verwendung von mehr als einer Blendenöffnung 105 ist, daß bei einem Blendenöffnungsdurchmesser von $0,5 \mu\text{m}$ - $10 \mu\text{m}$ Abstände von Blendenöffnungen eingehalten werden, die etwa $100 \mu\text{m}$ betragen. So ist gewährleistet, daß sich ausgehend von den

Blendenöffnungen 105 die elektrischen Feldlinien radial in das Meßmedium hinein erstrecken.

5 Fig. 27 zeigt eine erste Variante zur Konfiguration in Fig. 26. Hier ist der Abstandshalter 113' mit einem Kompartiment 114' für den Innenelektrolyten ausgestattet, das eine zusätzliche Möglichkeit zur Ent-
10 lüftung dieses Kompartimentes bietet. In der Blendenfolie 101" befindet sich eine Öffnung 116, über die das Probenkompartiment bei der Vakuumbefüllung
15 schneller entlüftet werden kann. Nach Befüllung der Konfiguration nach Fig. 27 kann die Entlüftungsöffnung 116 mit einem geeigneten Material (Epoxydharz, Silikon usw.) versiegelt werden. Ansonsten entspricht der Aufbau dem nach Fig. 26.

Fig. 28 zeigt eine zweite Variante der Konfiguration nach Fig. 3. Hier befinden sich auf dem Träger 112
20 zwei Elektrodenschichten 2", 2'". In dieser Ausführungsform trägt die Blendenfolie 101" zwei Blendenöffnungen 105", 105'". Sind in der unmittelbaren Umgebung der Blendenöffnungen 105" und 105'" unterschiedliche molekulare Bindungspartner immobilisiert,
25 so lassen sich unterschiedliche Analyte nachweisen. Dies entspricht einer Anordnung von zwei Mikroelektroden, wie dies oben beschrieben ist. Die Konfiguration mit zwei Elektroden und dazugehörigen Blenden-
30 öffnungen kann auch zu einem größeren Array mit einer Vielzahl von Elektroden- und Blendenöffnungen erweitert werden.

In Fig. 29 ist eine weitere Variante der Konfiguration nach Fig. 26 gezeigt. Hier ist zusätzlich auf der
35 Blendenfolie 101' ein Träger 117 für ein Probenkompartiment 118 aufgebracht. Dieser Träger 117 kann aus jedem beliebigen Kunststoff hergestellt sein, der mit

der verwendeten Probe kompatibel ist und sich auf der
Blendenfolie 101' durch Klebetechnik oder durch Heiß-
laminieren und durch ein anderes Verfahren aufbringen
läßt. Zusätzlich ist hier auf der Blendenfolie 101'
5 eine Gegenelektrode 120 aufgebracht. Für das Aufbrin-
gen und das Material der Gegenelektrode gilt das
gleiche, wie im Beispiel nach Fig. 26 für die Elek-
trode 2 beschrieben ist. Die Gegenelektrode 120 kann
am elektrischen Anschluß 121 kontaktiert werden. Vor-
10 richtungen mit Probenkompartimenten können auch in
Array-Form mit einer Vielzahl von Kompartimenten rea-
lisiert werden.

Fig. 30 zeigt eine besondere Ausführungsform der
15 Blende 101, wie sie in Fig. 24 und folgenden darge-
stellt ist.

In diesem neuen Ausführungsbeispiel ist die Blende
auf der Basis einer Siliziumscheibe realisiert. Eine
20 Siliziumscheibe 108 wurde mit Hilfe bekannter ani-
sotroper Ätzverfahren perforiert. Dabei entstehen
Öffnungen 109 die einen pyramidenstumpfförmigen Cha-
rakter haben. Auf diese Weise ist es möglich, sehr
kleine Öffnungen zu realisieren. Soll zum Beispiel
25 die Öffnung auf der unteren Seite der Siliziumscheibe
108 ca. 1 μm betragen, so beträgt die große Öffnung
auf der Vorderseite der Siliziumscheibe ca. 8 μm . Die
Siliziumscheibe wird nach einbringen der Öffnungen
109 an der Oberfläche elektrisch isoliert. Dies läßt
30 sich zum Beispiel durch thermische Oxydation und/oder
durch CVD-Verfahren mit Si_3N_4 realisieren.

In Fig. 30b ist eine Variante der Blende nach Fig.
30a gezeigt. Auf einem Träger 108' wurde durch ge-
35 kannte epitaktische Verfahren eine Schicht 106 abge-
schieden. Durch bekannte anisotropische Ätzverfahren

läßt sich ortselektiv die Siliziumscheibe 108' oberhalb der Schicht 106 abätzen. Mit Hilfe lithographischer Verfahren können Öffnungen 104 und 104' in die Schicht 106 eingebracht werden. Dieses Beispiel hat den Vorteil, daß die Öffnungen sich in einer sehr dünnen Schicht 106 befinden. Die Siliziumscheibe kann eine Dicke von ca. 300 µm haben, während die Schicht 106 eine Dicke zwischen 1 und 100 µm (vorzugsweise 10 µm) besitzt.

In Fig. 31 ist eine Meßanordnung für ein Verfahren zur potentiometrischen Messung zum Nachweis von Analyten dargestellt.

Auf einem Träger 122 befindet sich die Festableitung 123 einer potentiometrischen Elektrode mit einer ionenselektiven Membran 124. An der Oberfläche der ionenselektiven Membran 124 sind Moleküle immobilisiert, die mit den Molekülen, die auf den Partikeln 5 immobilisiert sind, eine Bindung 6 eingehen können. Die an der Oberfläche der ionenselektiven Membran 124 gebundenen Label- oder Markerpartikel 5, die in diesem Ausführungsbeispiel einen Durchmesser von 10 nm aufweisen, rufen eine Störung der Potentialbildungsvorgänge an der Oberfläche der ionenselektiven Membran 124 hervor, die auf potentiometrischem Wege gemessen werden kann. Gemessen wird das Potential der aus Festableitung 123 und ionenselektiven Membran 124 bestehender ionenselektiven Elektrode gegen eine Bezugselektrode, die sich ebenfalls im Meßmedium 3 befindet, aber nicht dargestellt ist.

In diesem Ausführungsbeispiel ist der Träger 122 zum Beispiel aus Glas, die Festableitung 123 der potentiometrischen Elektrode besteht aus Silber und die ionenselektive Membran 124 aus einer Ag/AgCl-Schicht.

Ebenso ist es möglich, die ionenselektive Membran 124 als Polymermembran auszubilden. Auch können andere bekannte Materialien für ionenselektive Membranen eingesetzt werden. Es ist zusätzlich möglich, oberhalb der ionenselektiven Membran ohne immobilisierte Moleküle keine weitere Schicht anzuordnen, in der sich die immobilisierten Bindungspartner befinden (ohne Abbildung). Diese Schicht kann zum Beispiel aus einem Hydrogel oder Kollagen bestehen.

Fig. 32 zeigt ein Ausführungsbeispiel für die Verwendung nach dem potentiometrischen Meßprinzip im Differenzverfahren. Auf einem Träger 125 befinden sich die Festableitungen 123 und 123' einer potentiometrischen Elektrode mit den Leiterbahnen 127 und 127' sowie den elektrischen Anschlüssen 128 und 128'. Träger und Elektroden sowie Leiterbahnen sind mit der Abdeckung 126 gegenüber dem Meßmedium geschützt. Die Abdeckung 126 besitzt Durchbrüche 129 und 129', die die ionenselektiven Elektroden freilassen. Die Festableitung 123 und 123', die Leiterbahnen 127 und 127' sowie die elektrischen Anschlüsse 128 und 128' können zum Beispiel aus Silber nach bekannten Dünnschicht- oder Dickschichtverfahren hergestellt sein. Als ionenselektive Membran kann wiederum Ag/AgCl verwendet werden, wobei sie durch die Chloridisierung des Silberfilms der Festableitungen 123, 123' hergestellt werden kann.

Ebenso ist es möglich, in die Durchbrüche 129 und 129' Polymermembranen mit elektroaktiven Komponenten nach bekannten Verfahren herzustellen. Hierfür lassen sich Dispensierverfahren verwenden. Die Abdeckung 126 kann durch Siebdruckverfahren aufgebracht werden. Auch das Einbringen der ionenselektiven Membranen 124 und 124' kann durch Siebdruckverfahren geschehen.

Werden an der Oberfläche der ionenselektiven Membran 124 Moleküle immobilisiert, die eine Bindung 6 eingehen können, so läßt sich in einem Differenzverfahren das Signal dieser Elektrode mit dem Signal einer ionenselektiven Elektrode mit der ionenselektiven Membran 124' vergleichen, an deren Oberfläche keine Moleküle immobilisiert sind. Die Potentiale beider Elektroden können gegen eine externe Bezugselektrode gemessen werden. Hierfür sind konventionelle Bezugselektroden geeignet. Ebenso läßt sich eine beliebige Metallelektrode als Pseudoreferenz einsetzen.

Die Verwendung eines Differenzverfahrens hat den Vorteil, daß nichtspezifische Bindungen von Molekülen an der Oberfläche der ionenselektiven Membran bei diesem Meßverfahren nicht erfaßt werden.

Fig. 33 zeigt in einem weiteren Ausführungsbeispiel eine potentiometrische Elektrodenanordnung mit integriertem Fließkanal. Auf einem Träger 125' befinden sich die Festableitung 123 einer potentiometrischen Elektrode mit einer ionenselektiven Membran 124, die über eine Leiterbahn 127' mit einem elektrischen Anschluß 128' verbunden sind. Daneben sind eine Gegenelektrode 131 und eine Bezugselektrode 132 angeordnet. Die Elektroden 131, 132 können aus Edelmetallfilmen, zum Beispiel Platin bestehen. Auf dem Träger 125' sind auf einer Fläche 130 Markerpartikel schwach immobilisiert, die bei Kontakt mit einem wäßrigen Meßmedium gelöst werden können. Auf dem Träger 125' ist ein Kanalträger 133 durch Klebetechnik oder durch Heißlaminieren aufgebracht. Der Kanalträger 133 besitzt einen Durchbruch 134, der als Kanal wirkt. Mit Hilfe der Abdeckung 126' wird der Kanalträger 133 verschlossen. Durch die Durchbrüche 135, 136 kann das

wäßrige Meßmedium zu- und abgeführt werden. Die Abdeckung 126 ist durch Klebetechnik oder Heißlaminieren auf den Kanalträger aufgebracht.

5 In Fig. 34 ist der Kanal aus Fig. 33 als Fließmatrix 137 realisiert. Auf einem Träger 125 befindet sich die gleiche Elektrodenanordnung wie in Fig. 33. Über den Elektroden ist eine Fließmatrix 137 angeordnet. Sie besteht zum Beispiel aus Filterpapier oder einer
10 Glasfasermatrix oder anderen Materialien, die durch Klebeverfahren oder durch Anpressen auf den Träger 125 aufgebracht werden. Auf der Fläche 30' sind Markerpartikel schwach immobilisiert. Das wäßrige Meßmedium wird auf die Fläche 138 aufgebracht, die zur
15 Probenaufnahme dient. Verbreitet sich das Meßmedium in der Fließmatrix 137, so werden Markerpartikel im Bereich der Fläche 130' gelöst und zu den Elektroden 123, 124, 131 und 132 transportiert.

20 Die potentiometrische Messung mit Hilfe von Vorrichtungen nach den Fign. 33 und 34 kann mit Hilfe einer elektrischen Schaltung erfolgen, die schematisch in Fig. 35 dargestellt ist. In einem Probenbehälter 139 befindet sich das wäßrige Meßmedium 3. In das Meßmedium 3 sind ein Träger 125' mit einer ionenselektiven Elektrode aus Festableitung 123 und ionenselektiver
25 Membran 124, eine Gegenelektrode 131 und eine Bezugselektrode 132 eingetaucht. Zwischen der ionenselektiven Elektrode und der Gegenelektrode wird mit Hilfe einer Stromquelle 140 ein elektrischer Strom eingespeist. Zwischen der ionenselektiven Elektrode 123, 124 und der Bezugselektrode 132 kann auf potentiometrischem Wege mit einer hochohmigen Spannungsmeßeinrichtung 141 das potentiometrische Meßsignal als
30 elektrische Spannung gemessen werden.

5 Mit Hilfe des elektrischen Stromes zwischen der ionenselektiven Elektrode und der Gegenelektrode erfolgt der Markerpartikeltransport auf elektrophoretischem Wege. Dies ist möglich bei Verwendung von potentiometrischen Elektroden, die relativ niederohmig sind. Dies ist zum Beispiel bei Ag/AgCl-Elektroden der Fall.

10 Bei hochohmigen potentiometrischen Elektroden wird auf die Gegenelektrode 131 und die Stromquelle 140 verzichtet. Hierbei muß der Markerpartikeltransport auf magnetischem Wege erfolgen, wie weiter oben beschrieben ist.

15 Die beschriebenen Assays können nicht nur für die hier beschriebenen Analyte, sondern auch generell zum Nachweis von Antikörpern, Antigenen, Nukleinsäuren, Aptameren oder anderen beliebigen Analyten zur Analyse und/oder Diagnostik in der Chemie, Lebensmittelchemie, Biotechnologie, Umweltanalytik, Biochemie
20 oder Medizin eingesetzt werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Analyten in Meßlösungen mittels Markerpartikeln,
dadurch gekennzeichnet,
daß Markerpartikel verwendet werden, deren elektrische und/oder elektrochemische Eigenschaften von den elektrischen und/oder elektrochemischen Eigenschaften der Meßlösung verschieden sind,
daß in der Meßlösung ein elektrisches Feld erzeugt wird, und
daß durch die Markerpartikel verursachte Änderungen eines elektrischen Stroms oder einer elektrischen Spannung an einer in der Meßlösung befindlichen Elektrode bestimmt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Markerpartikel sich bezüglich ihrer stofflichen Zusammensetzung, ihrer Dielektrizitätskonstanten und/oder ihres spezifischen elektrischen Widerstandes und/oder ihrer Oberflächenladungsdichte von der Meßlösung unterscheiden.
3. Verfahren zum Nachweis von Analyten in Meßlösungen mittels Markerpartikeln, dadurch gekennzeichnet, daß Markerpartikel verwendet werden, deren Permeabilitätszahl von der Permeabilitätszahl der Meßlösung verschieden ist, daß in der Meßlösung ein magnetisches Feld erzeugt wird und daß das durch die Markerpartikel verursachte magnetische Feld oder seine Änderung bestimmt wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Markerpartikel spezifisch an die Analyte binden, die gegebenenfalls ihrerseits spezifisch an eine Unterlage binden, die gegebenenfalls die Elektrode ist.
- 5
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die freien Analyte mit Markerpartikeln bzw. mit Markerpartikeln, an die Analyte gebunden sind, um die für die freien Analyte spezifischen Bindungsplätze auf einer Unterlage konkurrieren, die ggf. die Elektrode ist.
- 10
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Markerpartikel spezifisch an die Analyte binden und daß die Meßlösung anschließend zwischen zwei Elektroden hindurchfließt, durch die das elektrische Feld erzeugt wird oder daß die Meßlösung anschließend durch eine Durchflußmeßkammer fließt, in der das Magnetfeld erzeugt wird.
- 15
- 20
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der elektrische Strom zwischen den Elektroden bzw. die Kapazität beim Hindurchfließen der Meßlösung bestimmt wird.
- 25
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Markerpartikel mit einer elektrischen Ladung und/oder mit einem elektroaktiven Stoff und/oder mit Enzymen immobilisierte oder beladene Markerpartikel und/oder ferro-, dia- oder paramagnetische Markerpartikel verwendet werden.
- 30
- 35

- 5 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß vor der Bestimmung der Änderung des elektrischen Feldes durch die Markerpartikel in der Meßlösung ein elektrisches und/oder magnetisches Feld erzeugt wird, das auf die Markerpartikel eine Kraft ausübt.
- 10 10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß in der Meßlösung eine Wechselspannung und/oder ein in seiner Richtung wechselndes magnetisches Feld erzeugt wird.
- 15 11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß das elektrische und/oder magnetische Feld derart ausgebildet wird, daß es auf die Markerpartikel eine Kraft in Richtung der mit Bindungsplätzen für die Markierungspartikel versehenen Unterlage hin und/oder von dieser weg ausübt.
- 20 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß vor der Elektrode, über die ein inhomogenes elektrisches Feld in der Meßlösung erzeugt wird, eine Blende mit einer Öffnung für den Durchtritt der elektrischen Feldlinien angeordnet wird und daß die Markerpartikel an oder in der Nähe der Blendenoberfläche gebunden werden.
- 25 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß das elektrische Feld an der Oberfläche einer potentiometrischen Elektrode durch Potentialbildungsvorgänge an der Grenzfläche zwischen Meßlösung und Elektrode gebildet wird und die Feldänderungen auf potentiometrisch
- 30
- 35

metrischem Wege gemessen werden.

14. Vorrichtung zur Bestimmung von Analyten in Meß-
lösungen mittels Markerpartikeln mit einem Trä-
ger, dadurch gekennzeichnet, daß die Markerpar-
tikel elektrische Eigenschaften und/oder elek-
trochemische Eigenschaften aufweisen, die von
den elektrischen und/oder elektrochemischen Ei-
genschaften der Meßlösung verschieden sind, und
daß auf dem Träger mindestens eine Elektrode ei-
ner Elektrodenanordnung angeordnet ist, die mit
einer Vorrichtung zur Erzeugung eines elektri-
schen Feldes verbunden ist und daß eine Meßein-
richtung zur Erfassung des elektrischen Stroms
oder der elektrischen Spannung vorgesehen ist.
15. Vorrichtung nach Anspruch 14, dadurch gekenn-
zeichnet, daß auf dem Träger eine Unterlage mit
spezifischen Bindungsstellen für den Analyten
angeordnet ist und die Markerpartikel spezifi-
sche Bindungsstellen für die Analyte oder die
Unterlage aufweisen, wobei Markerpartikel auf
dem Träger oder der Abdeckung angeordnet sind.
16. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekenn-
zeichnet, daß die Unterlage als Elektrode ausge-
bildet ist.
17. Vorrichtung nach Anspruch 14, dadurch gekenn-
zeichnet, daß die Markerpartikel spezifische
Bindungsstellen für den Analyten aufweisen, und
auf dem Träger eine zweite Elektrode derart an-
geordnet ist, daß zwischen der ersten und zwei-
ten Elektrode eine Öffnung für den Durchfluß der
Meßlösung besteht.

18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß sie nach außen durch eine Membran abgeschlossen ist, die für den Analyten und gegebenenfalls für die Meßlösung durchlässig ist.
19. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 14 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Markerpartikel eine elektrische Ladung aufweisen und/oder magnetisch und/oder mit einem elektroaktiven Stoff und/oder mit Enzymen versehen sind.
20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß auf dem Träger ein umpolbares magnetisches Element angeordnet ist.
21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß vor einer Elektrode zur Erzeugung eines inhomogenen elektrischen Feldes eine mit der Meßlösung in Verbindung stehende Blende (101, 105) angeordnet ist, die mindestens eine kleine Öffnung aufweist und die als Bindungselement für die Markerpartikel dient.
22. Vorrichtung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der Raum zwischen Blende (101, 105) und Elektrode (2) mit einem Elektrolyten (103) ausgefüllt ist, der mit der Meßlösung (3) in Kontakt ist.
23. Vorrichtung nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß die blende (101, 105) Bestandteil einer Pipette (119) ist, in die die Elektrode (2) hineinragt.

24. Vorrichtung nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß mit dem die mindestens eine Elektrode aufweisenden flachen Träger (112) ein mit mindestens einer Durchbrechung (114) zur Aufnahme des Elektrolyten (103) versehenes Abstandselement (113) fest verbunden ist und daß die Durchbrechung (114) mit einer als Blende dienenden Abdeckung (101) abgedeckt ist, in der mindestens eine Blendenöffnung (105) vorgesehen ist.
25. Vorrichtung nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Elektroden (2) auf dem Träger (112) aufgebracht sind, das Abstandselement (113) mit mehreren den Elektroden zugeordneten Durchbrechungen versehen ist und die Abdeckung mindestens eine Blendöffnung für jede Durchbrechung aufweist.
26. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß eine Gegenelektrode (120) auf der der Meßlösung zugewandten Seite der Abdeckung (101) mit Blendöffnung (105) aufgebracht ist.
27. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Blende pyramidenstumpfförmig ist.
28. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens eine auf dem Träger (122, 125) angeordnete Elektrode ausgebildet ist und eine mit der Meßlösung in Verbindung stehende ionenselektive Membran (124) aufweist, die die Markerpartikel bindet.

29. Vorrichtung nach Anspruch 14 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens zwei Elektroden (123, 124) auf einen Träger (125) aufgebracht sind, die von einem Abdeckelement (126) mit mindestens zwei Durchbrechungen (129) abgedeckt sind.
30. Vorrichtung nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß die jeweilige ionenselektive Membran in der Durchbrechung (129) angeordnet ist.
31. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß Markerpartikel mit einem Durchmesser verwendet werden, der im nm-Bereich bis in den Sub-mm-Bereich liegt.
32. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 28 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens eine mit einer ionenselektiven Membran (124) versehene potentiometrische Elektrode (123, 124) und eine Bezugselektrode (103, 2) auf dem Träger (25') angeordnet sind und über den Elektroden ein mit einer Zu- und/oder Abführung versehener Fließkanal (134) für die Meßlösung vorgesehen ist.
33. Vorrichtung nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß auf einer mit dem Fließkanal (134) in Verbindung stehenden begrenzten Fläche (130) des Trägers (25') Markerpartikel durch die in dem Fließkanal (134) strömenden Meßlösung lösbar sind.
34. Vorrichtung nach Anspruch 33 oder 34, dadurch gekennzeichnet, daß der Fließkanal (134) in einer den Träger mindestens teilweise überdecken-

den Abdeckung (133, 26') ausgeformt ist, die eine Zuleit- und eine Ableitöffnung (135, 136) aufweist.

- 5 35. Vorrichtung nach Anspruch 33 oder 34, dadurch gekennzeichnet, daß der Fließkanal als Fließmatrix (137) mit einer die Meßlösung von außen aufnehmenden Fläche (138) ausgebildet ist.
- 10 36. Vorrichtung nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß auf einer begrenzten Fläche (30') der Fließmatrix Markerpartikel immobilisiert sind, die durch die in der Fließmatrix sich verbreitenden Meßlösung lösbar sind.
- 15 37. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 29 bis 36, dadurch gekennzeichnet, daß auf dem Träger (125, 25') eine Gegenelektrode (131) aufgebracht ist und daß zwischen potentiometrischer Elektrode (123, 124) und Gegenelektrode (131) eine Stromquelle (140) zum Einspeisen eines Stromes und zwischen potentiometrischer Elektrode und Bezugselektrode eine Spannungsmeßeinrichtung geschaltet sind.
- 20 38. Verwendung einer Vorrichtung oder eines Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche zum Nachweis von Antikörpern, Antigenen, Nukleinsäuren, Aptameren oder anderen Analyten zur Analyse und/oder Diagnostik in der Chemie, pharmazeutischen Entwicklung, Lebensmittelchemie, Biotechnologie, Umweltanalytik, Biochemie oder Medizin.
- 25
- 30

1 / 35

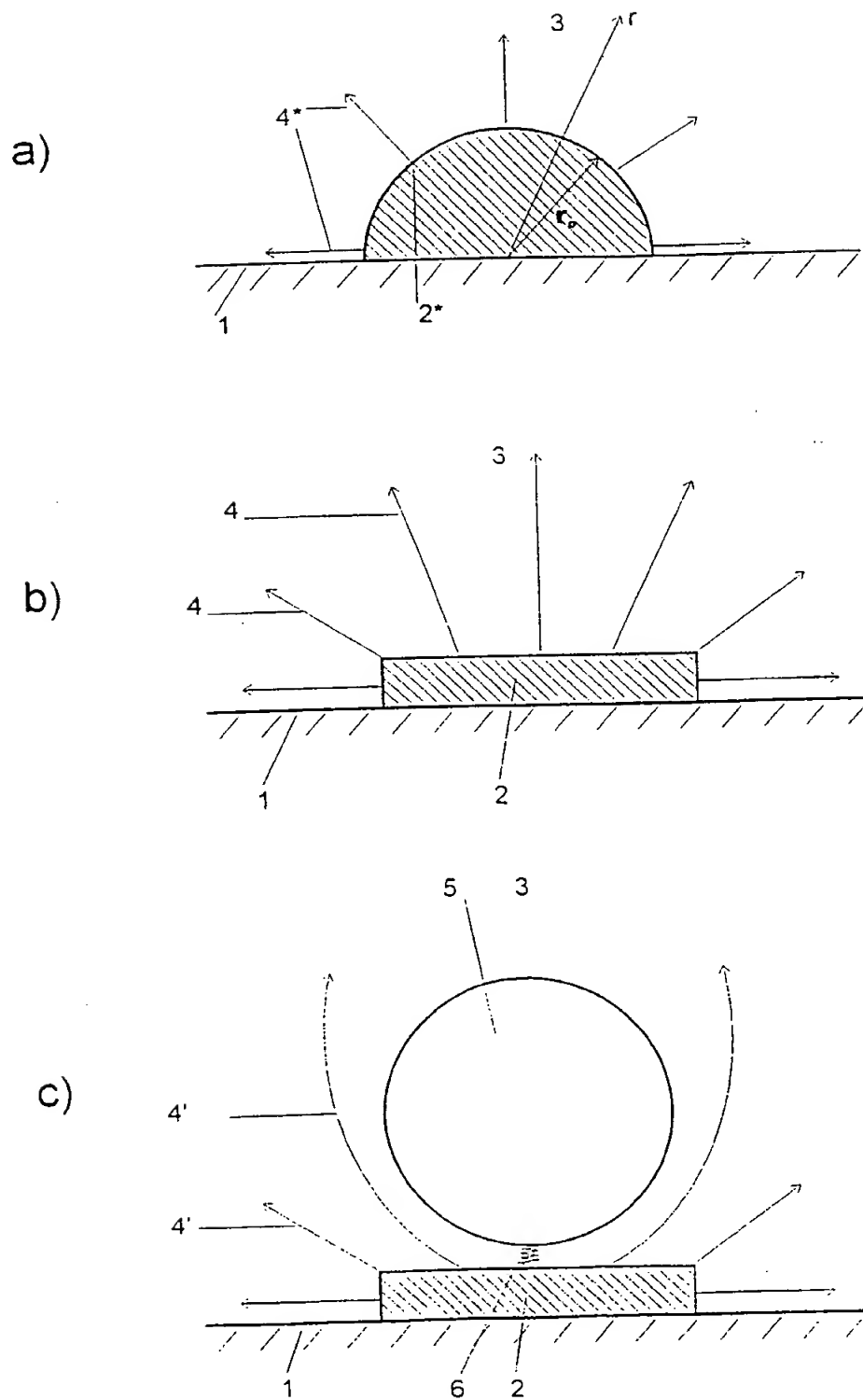


Fig. 1

2 / 35

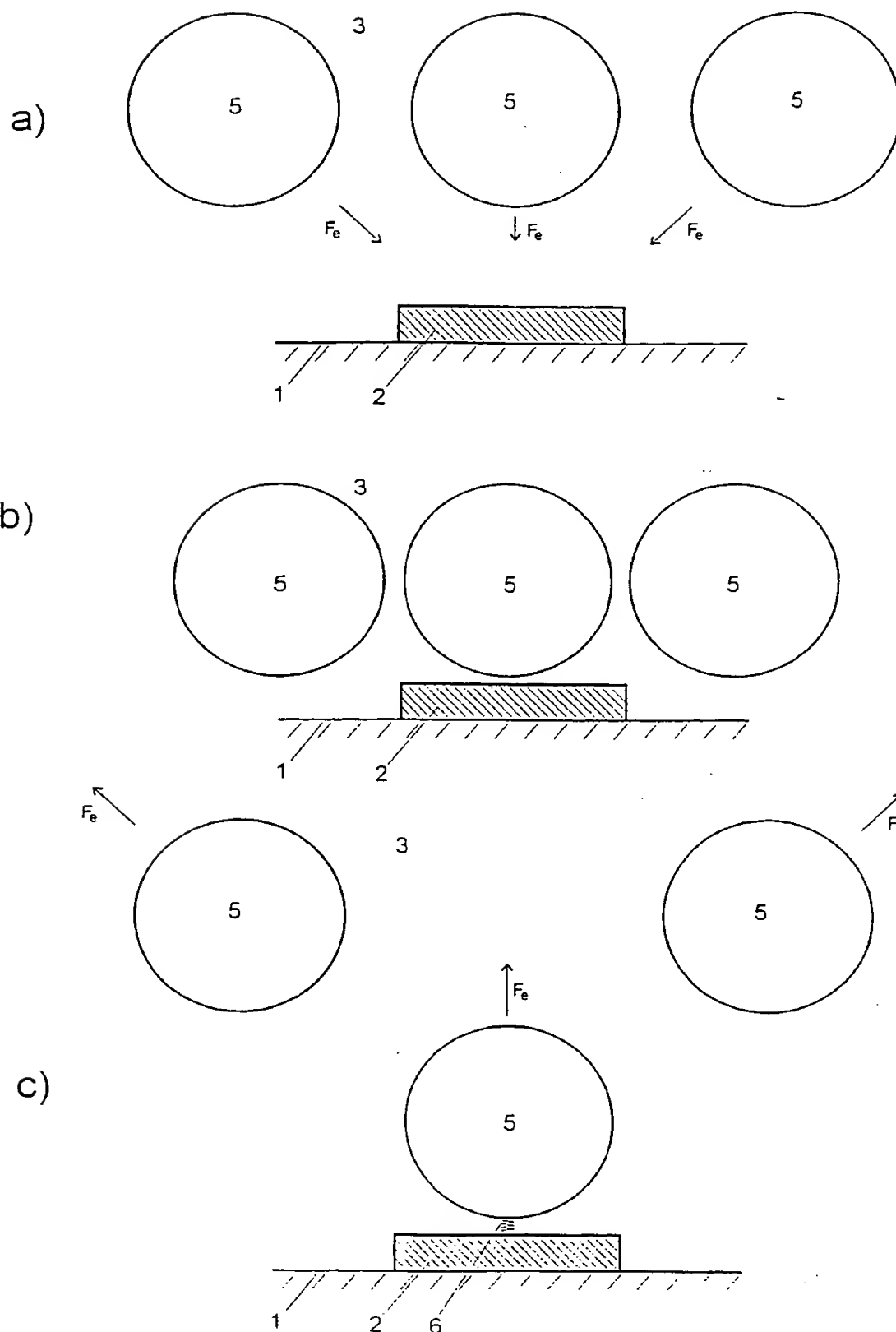


Fig. 2

3 / 35

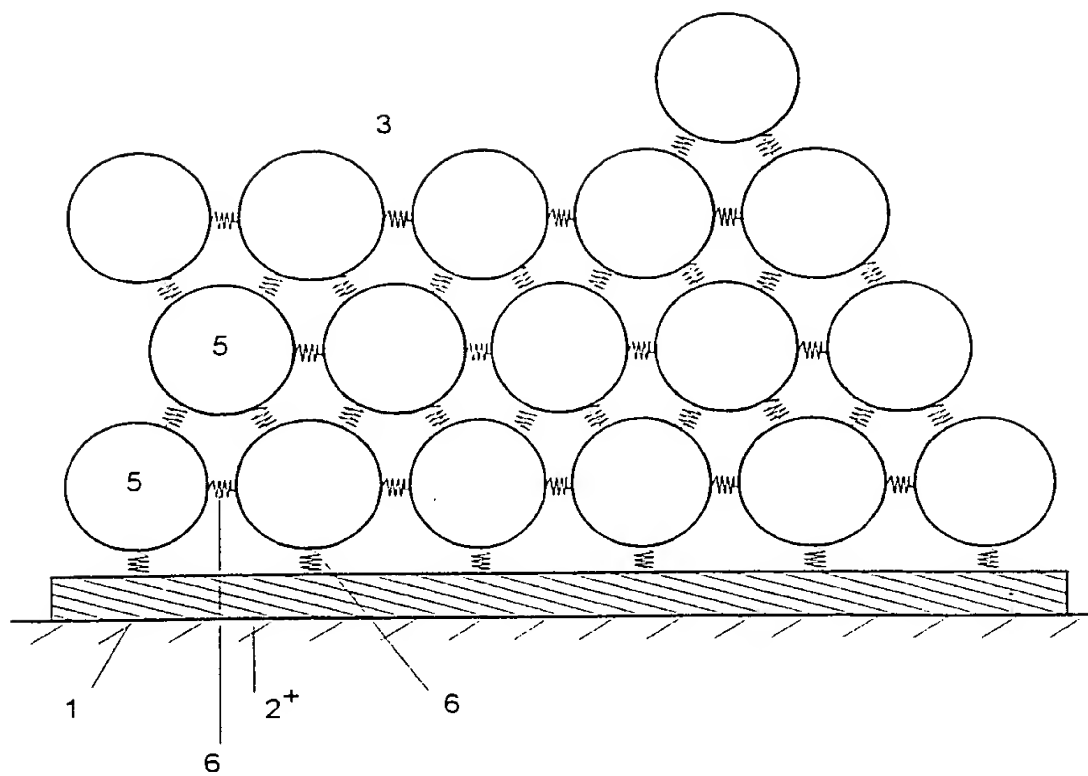


Fig. 3

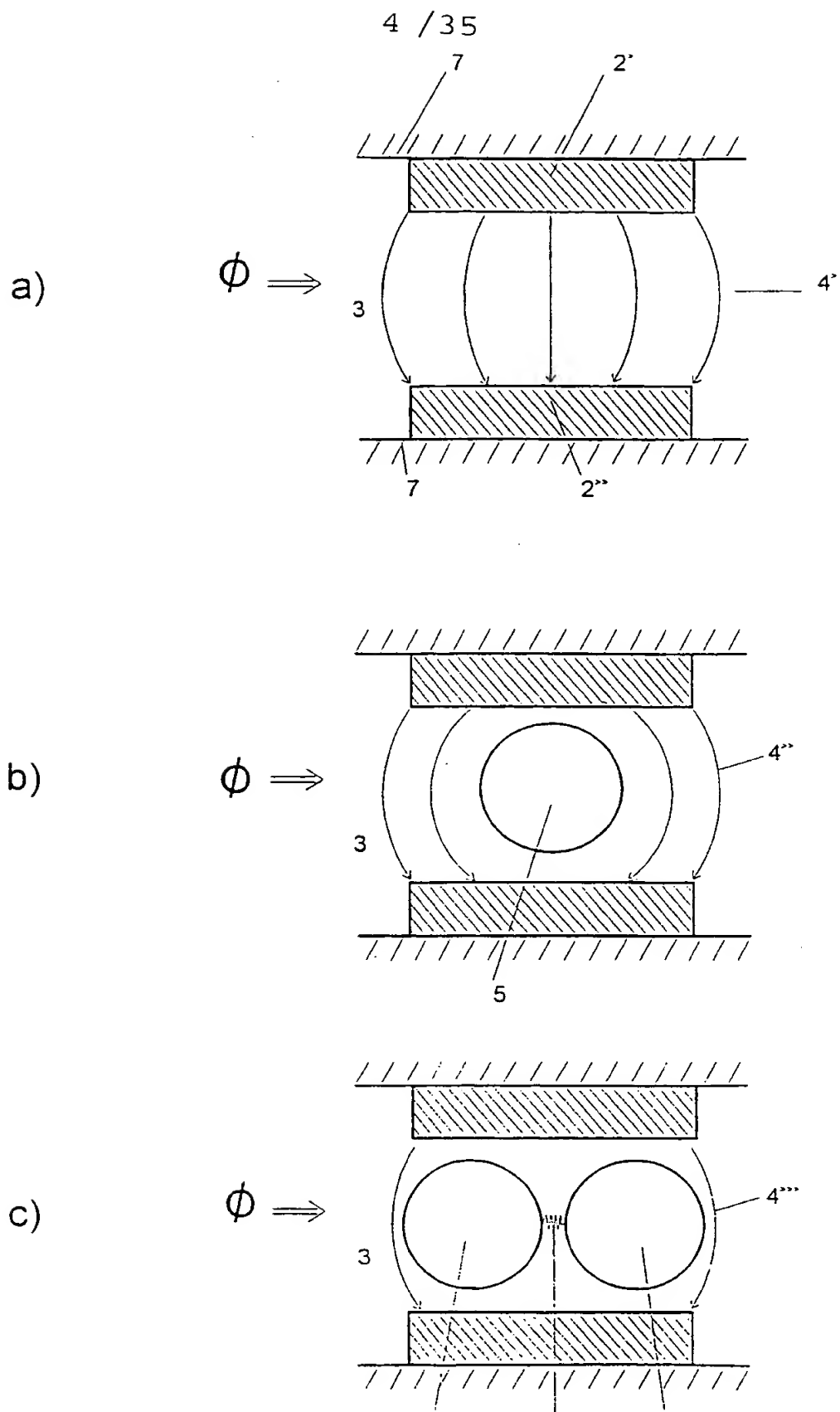


Fig. 4

5 / 35

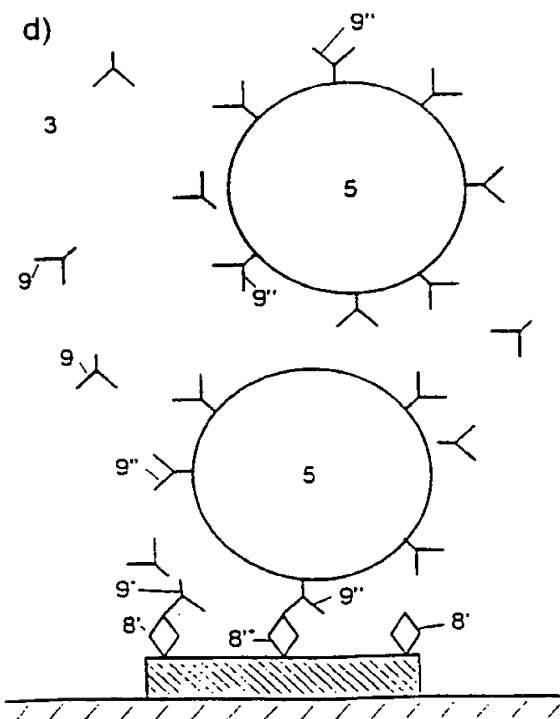
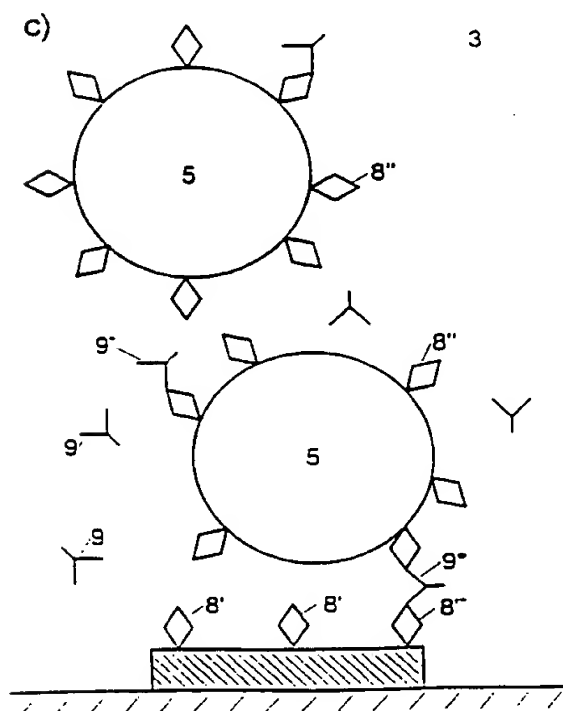
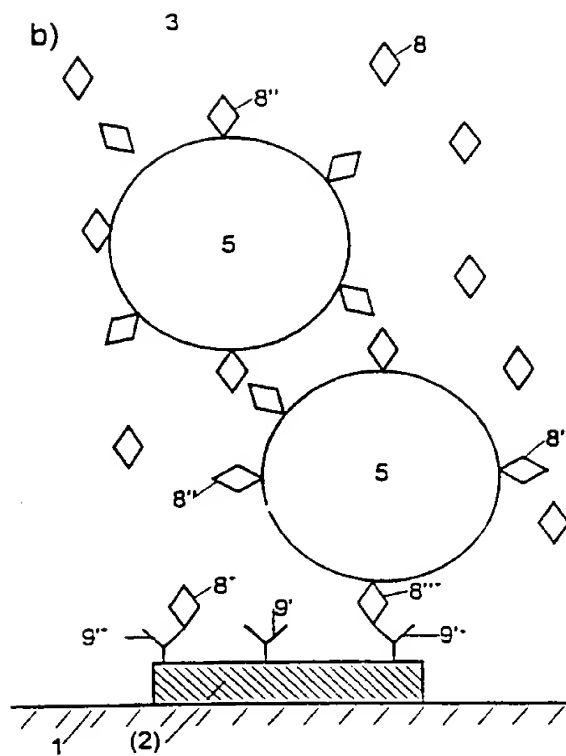
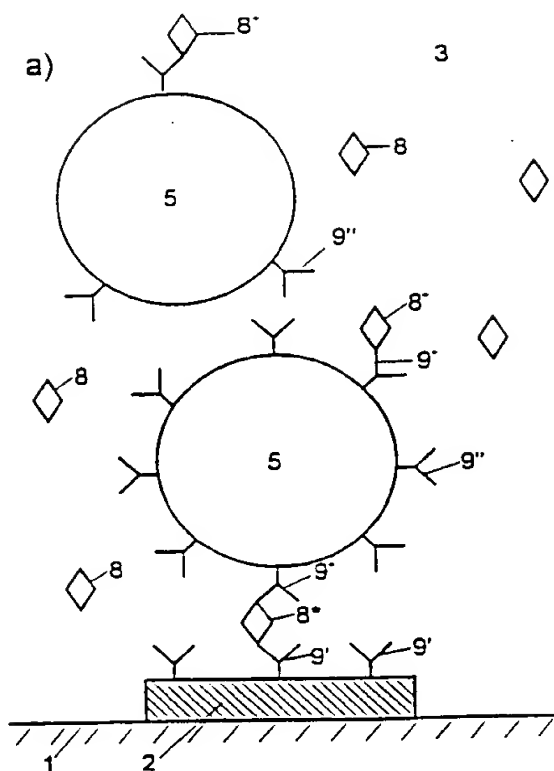


Fig. 5

6 / 35

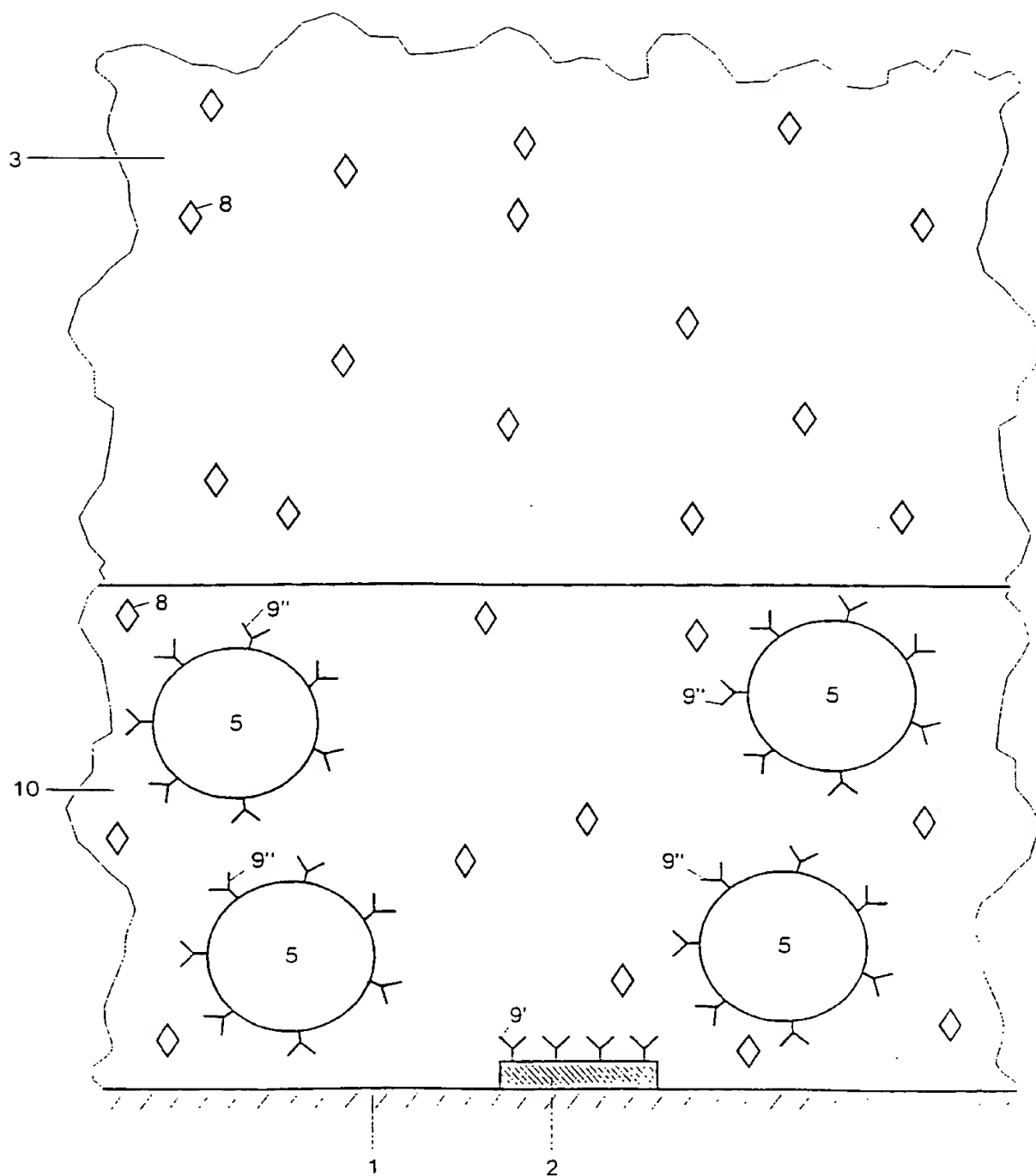


Fig. 6

7 / 35

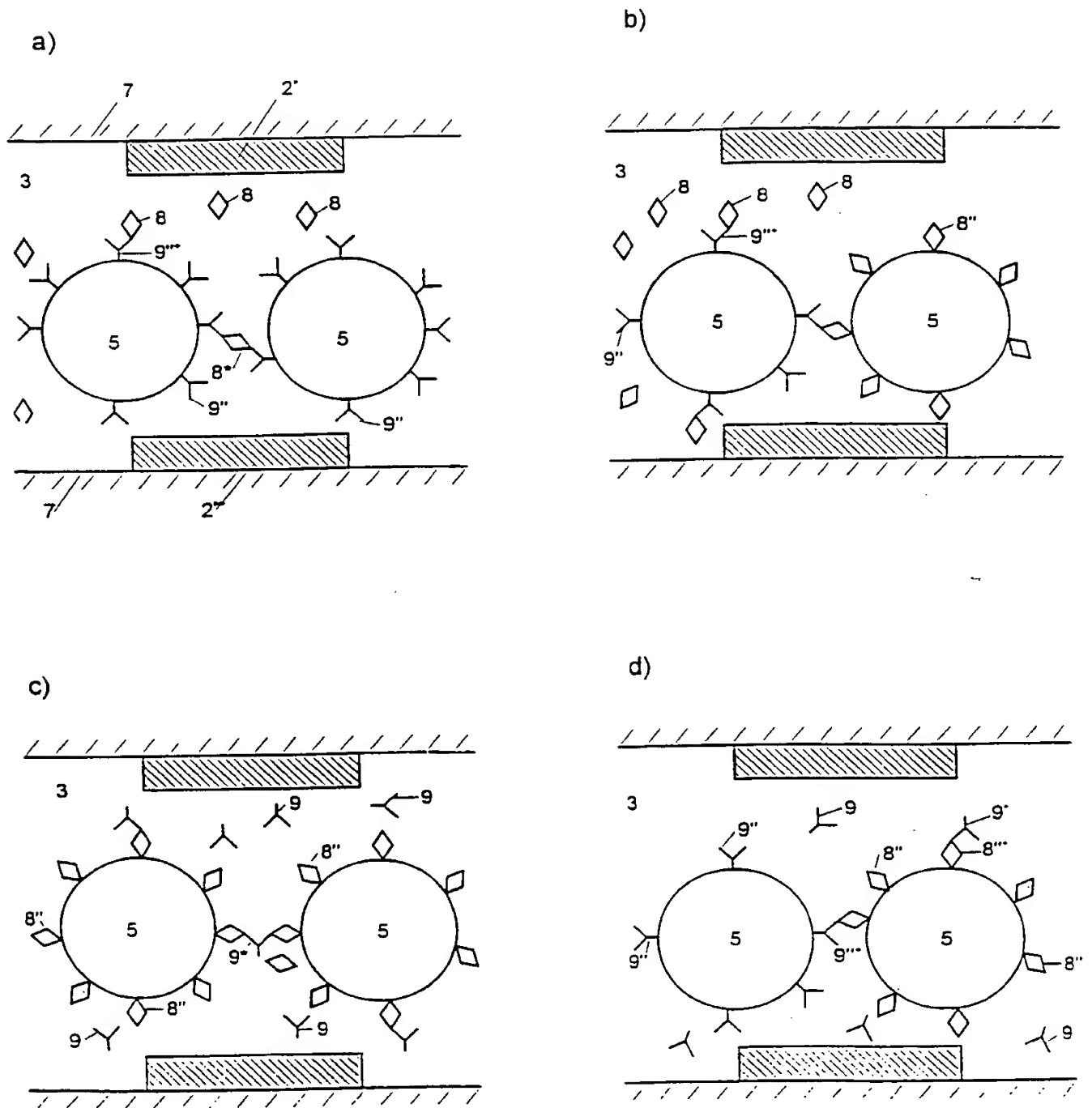
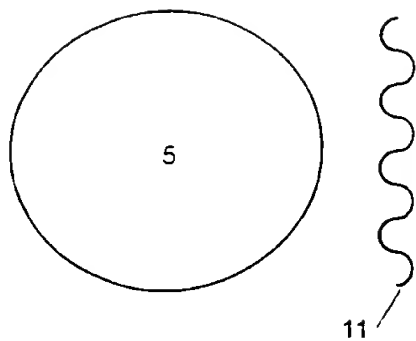


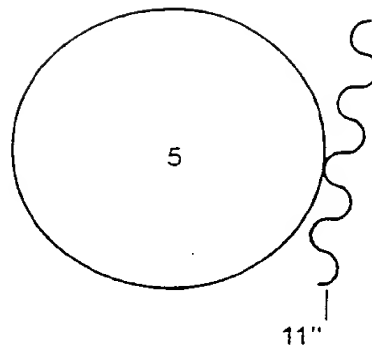
Fig.7

8 / 35

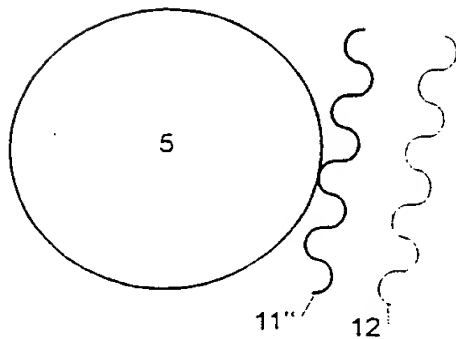
a)



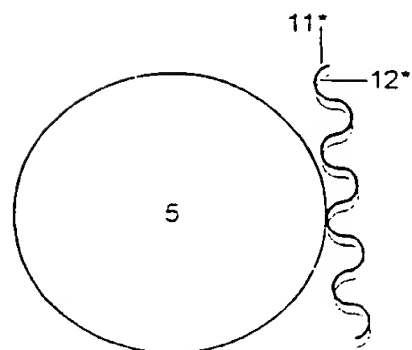
b)



c)



d)



e)

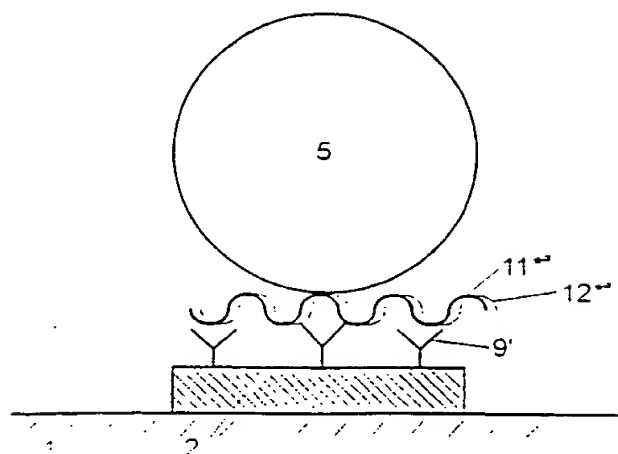
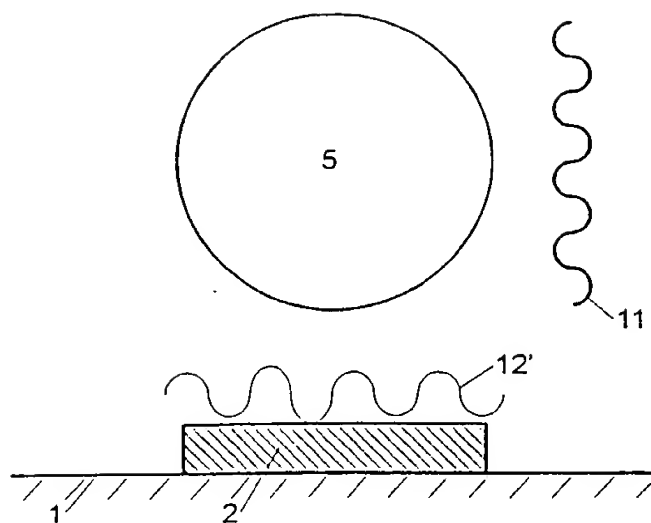


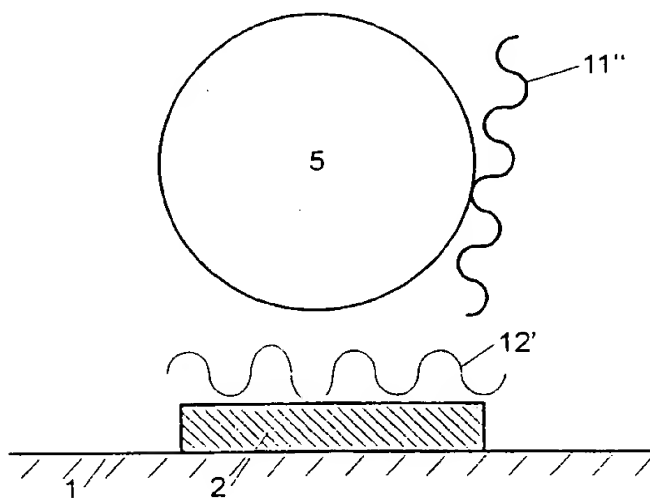
Fig. 8

9 / 35

a)



b)



c)

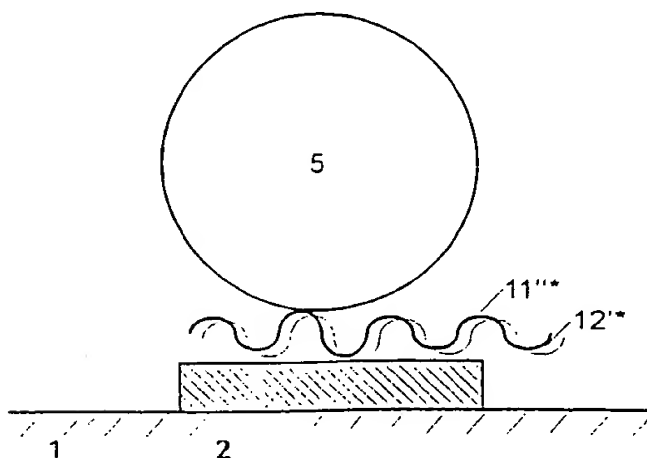


Fig. 9

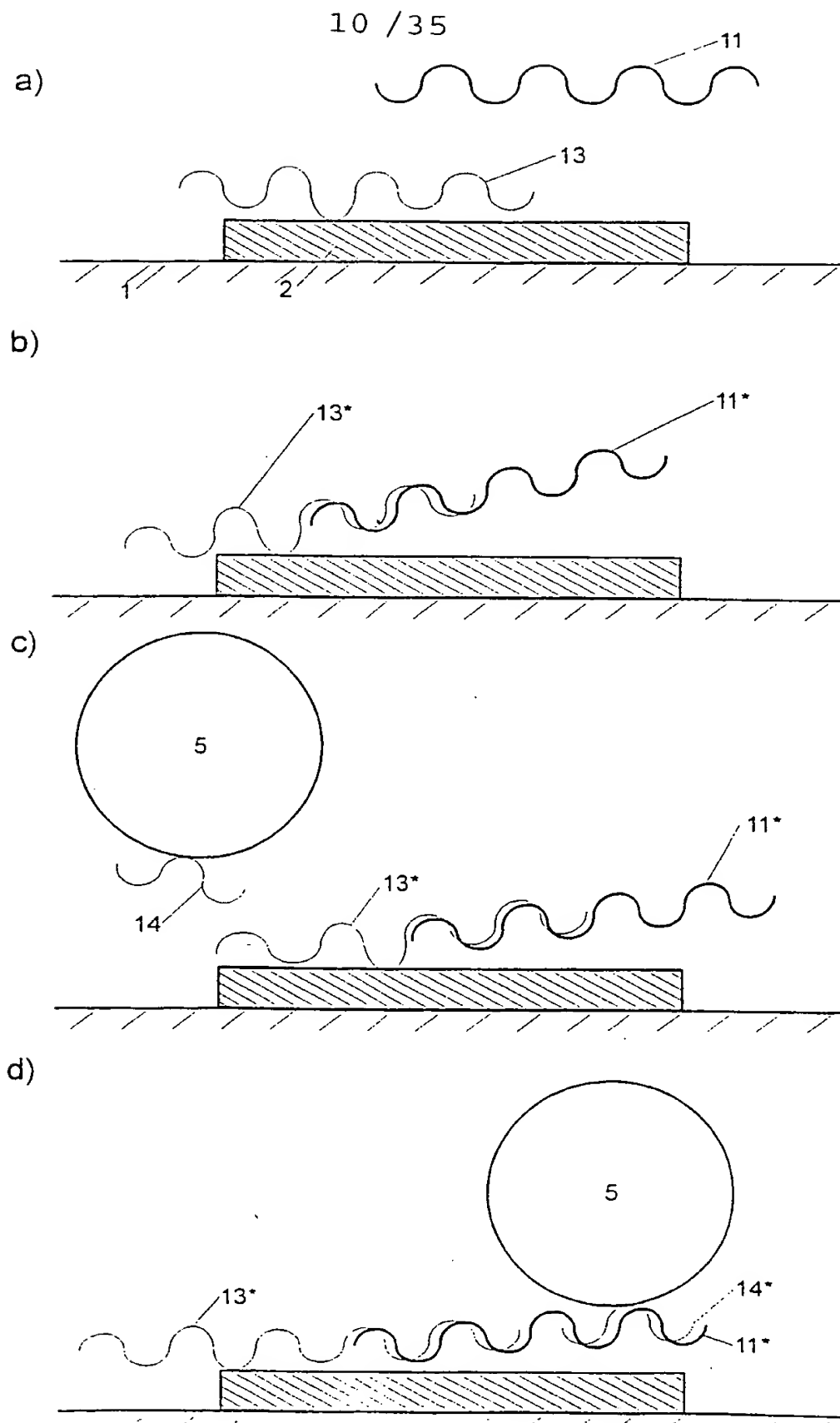
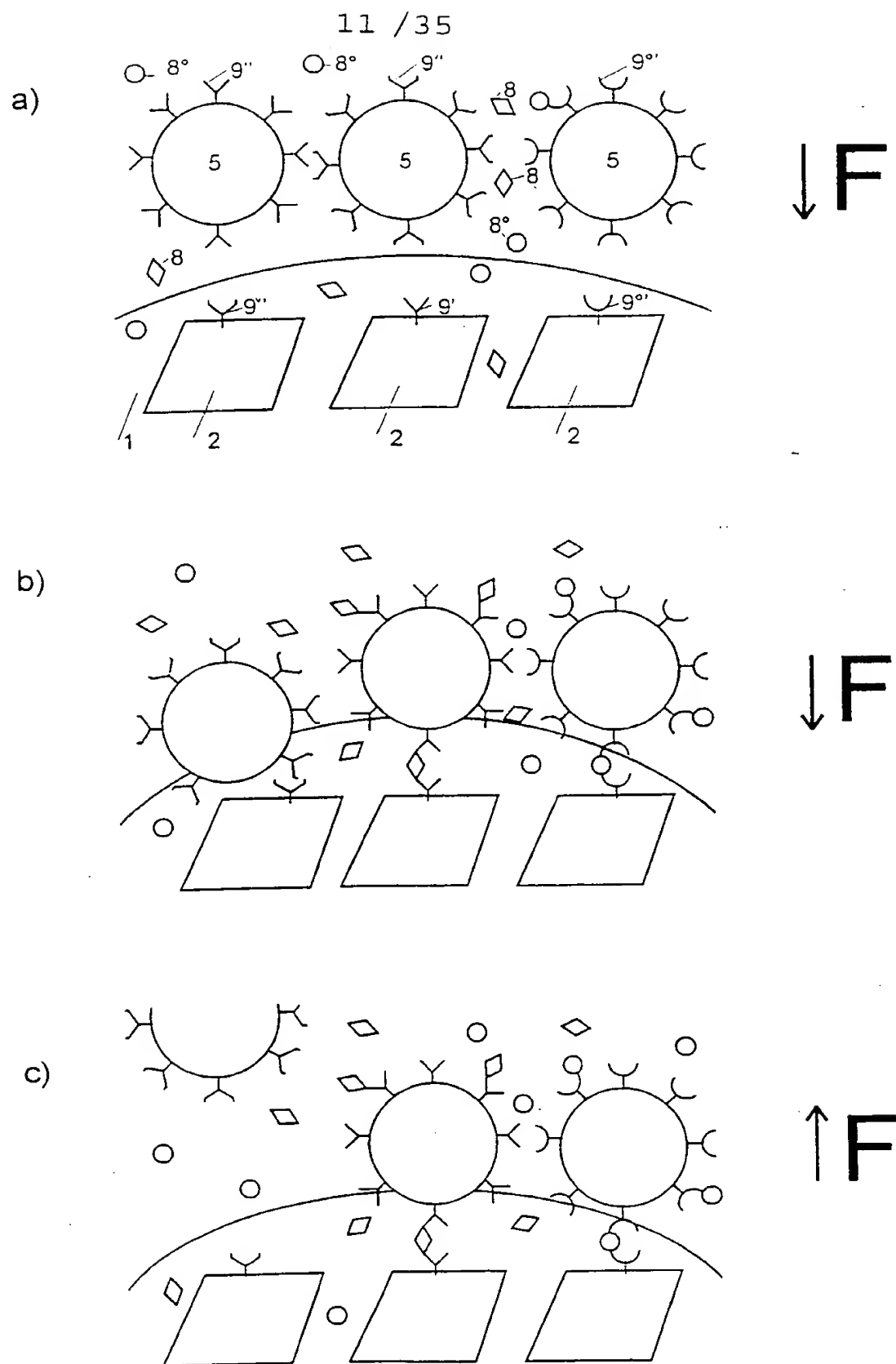


Fig. 10



12 / 35

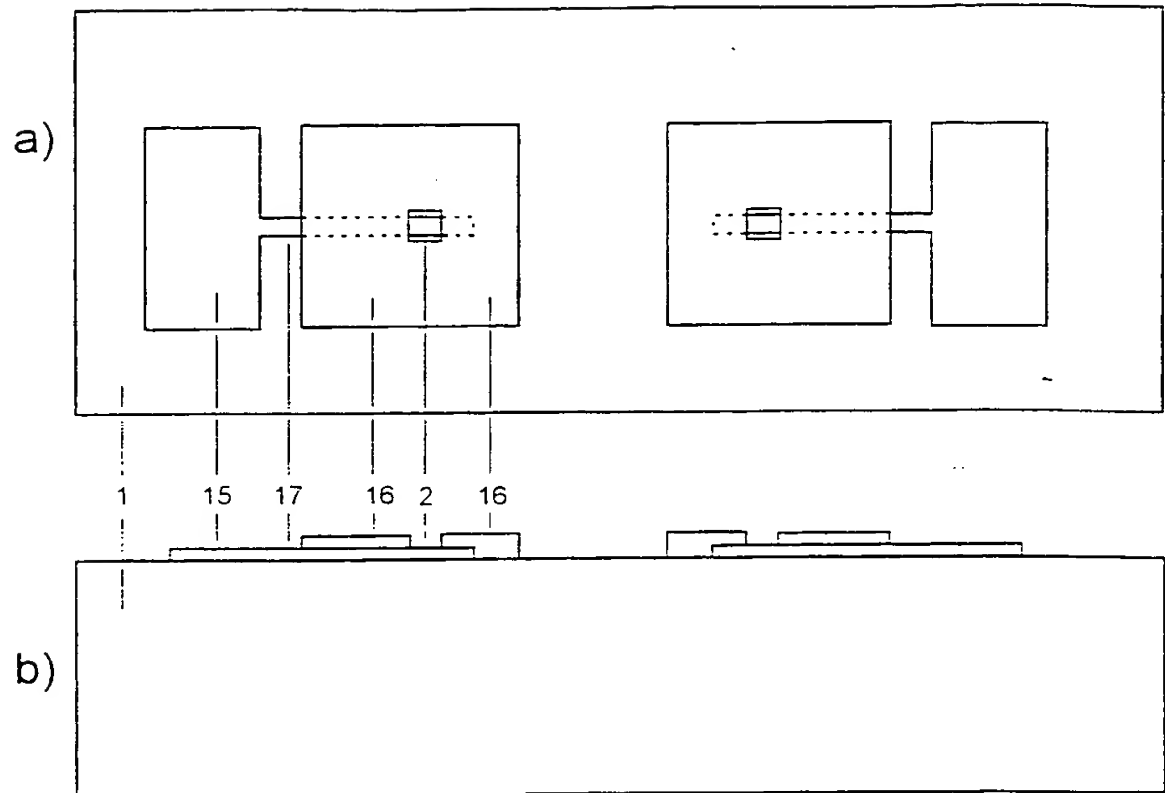


Fig. 12

13 / 35

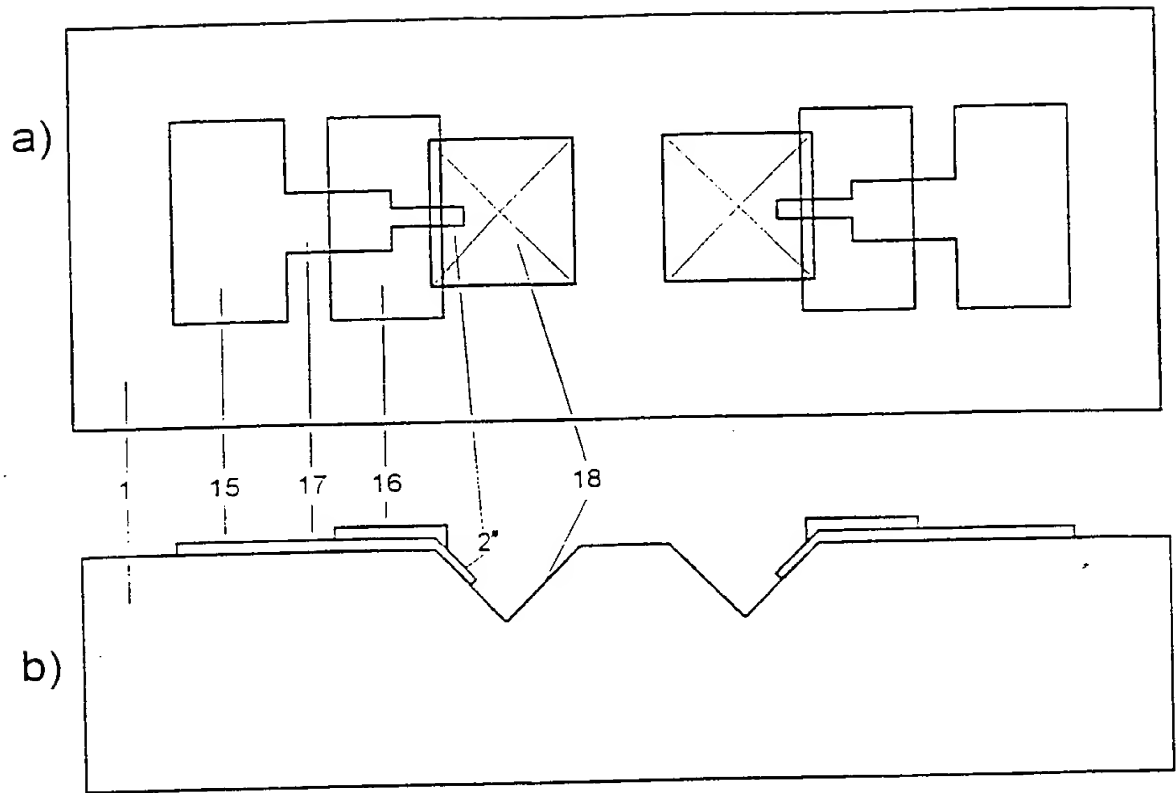


Fig. 13

14 / 35

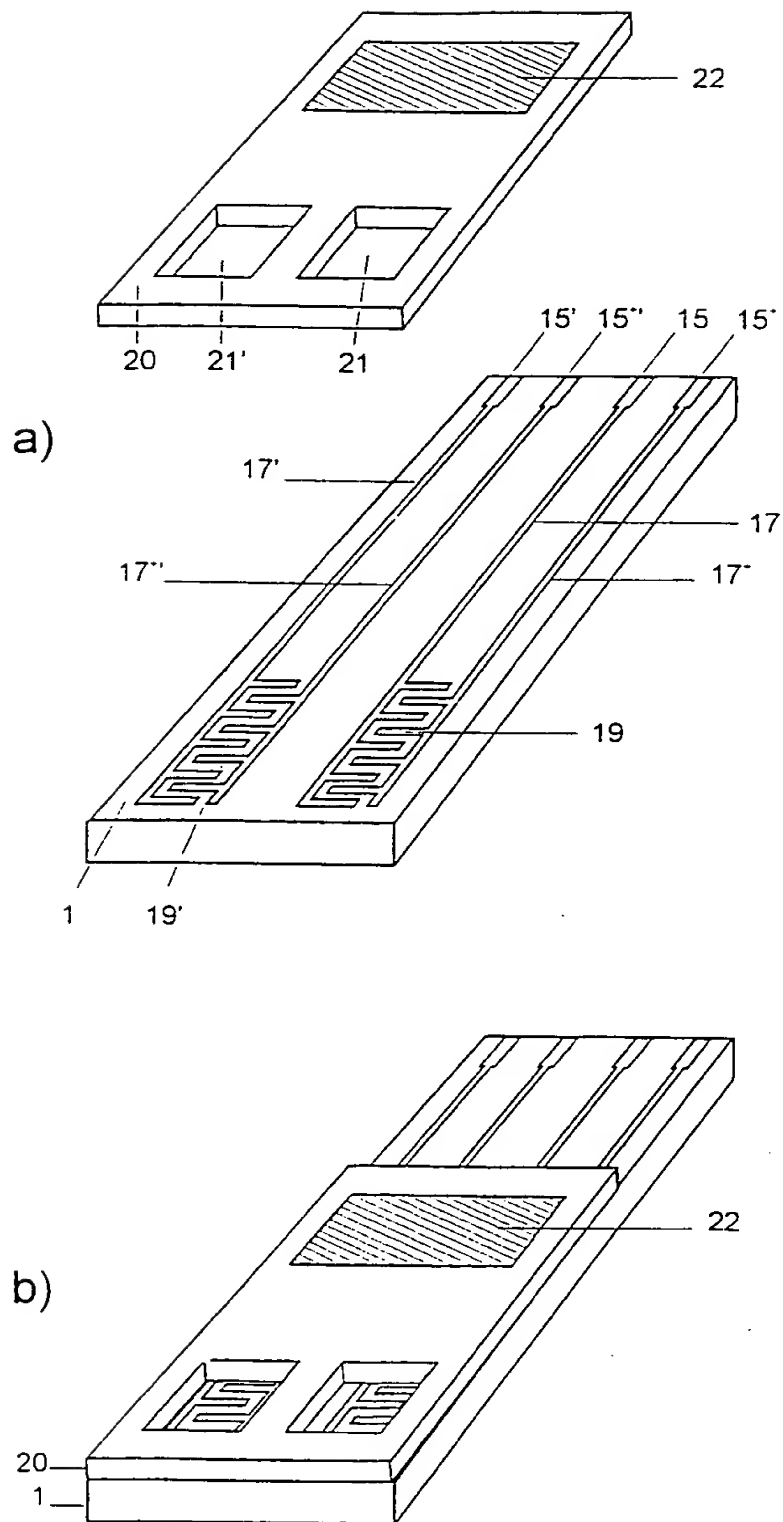


Fig. 14

15 / 35

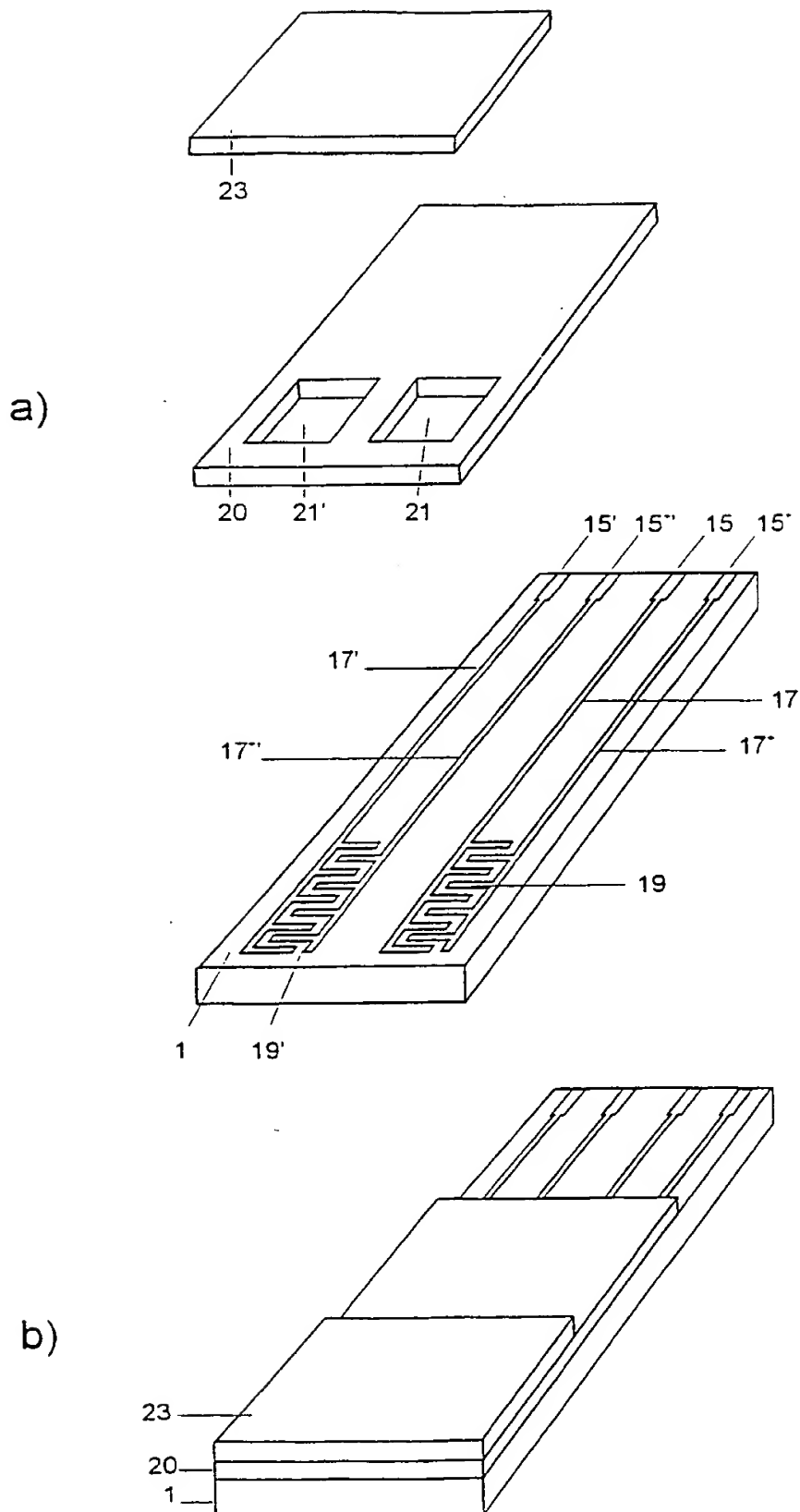


Fig. 15

16 / 35

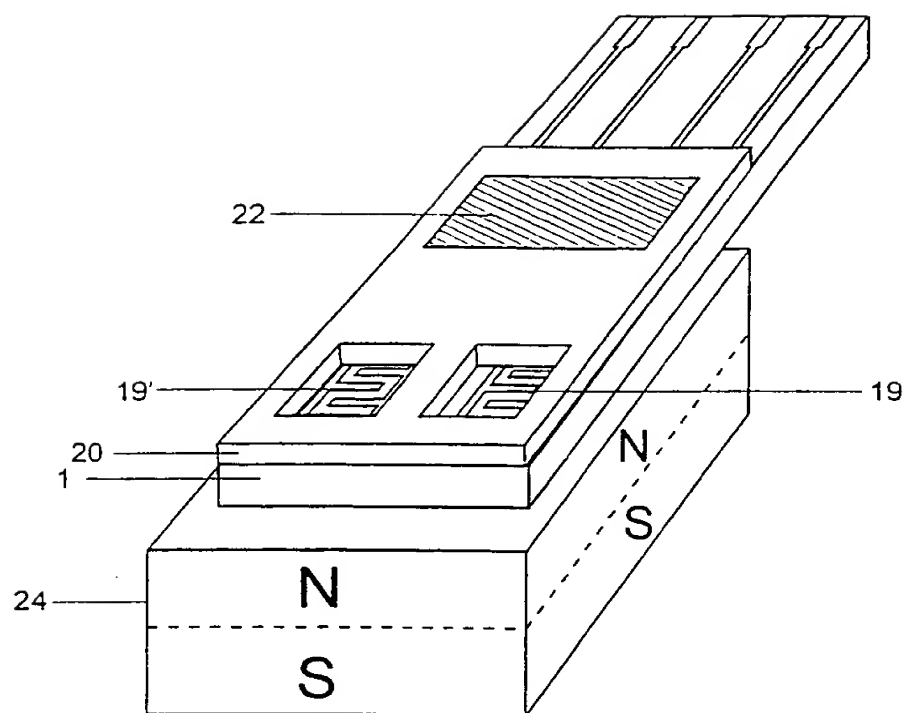


Fig. 16

17 / 35

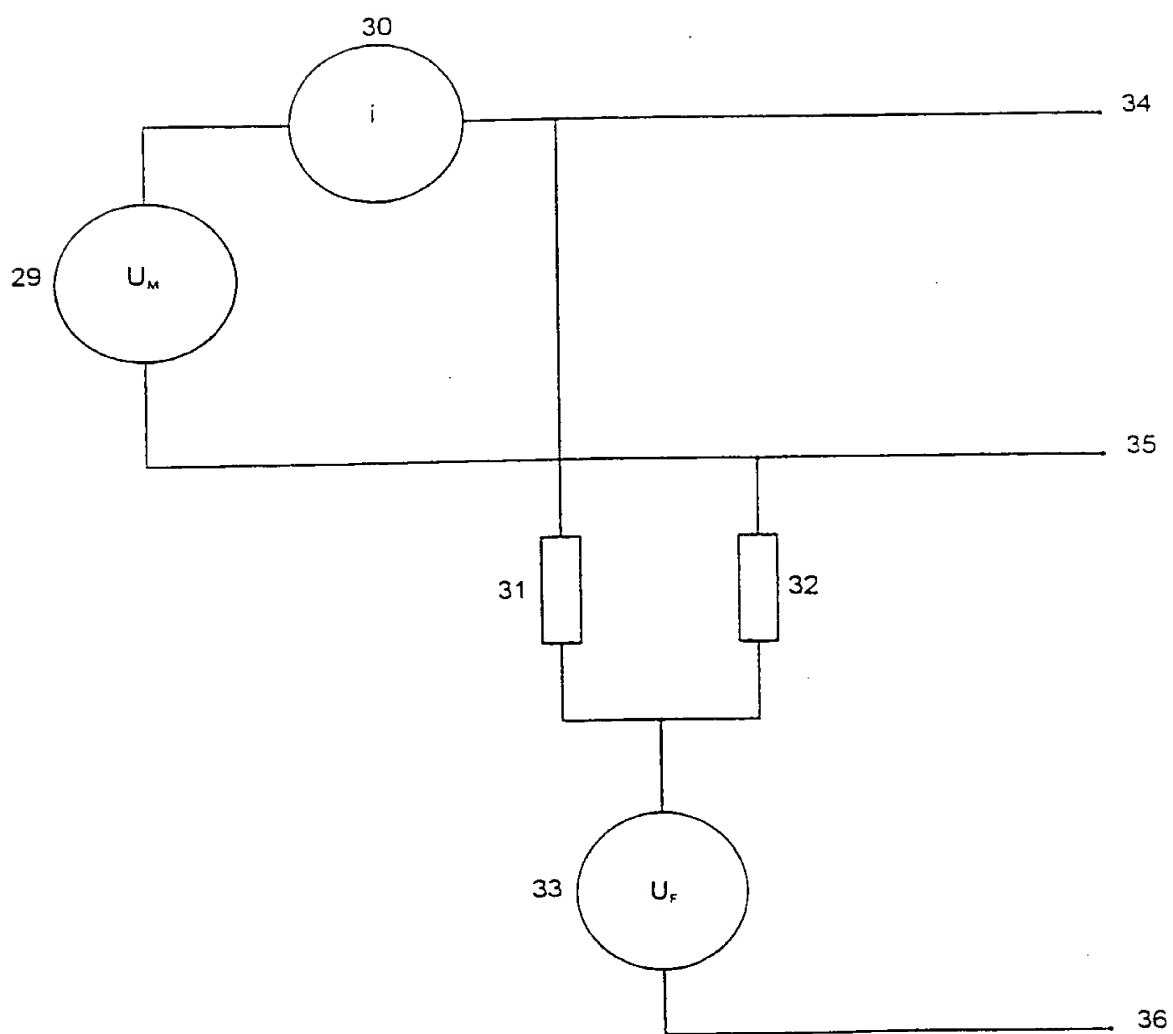


Fig. 17

18 / 35

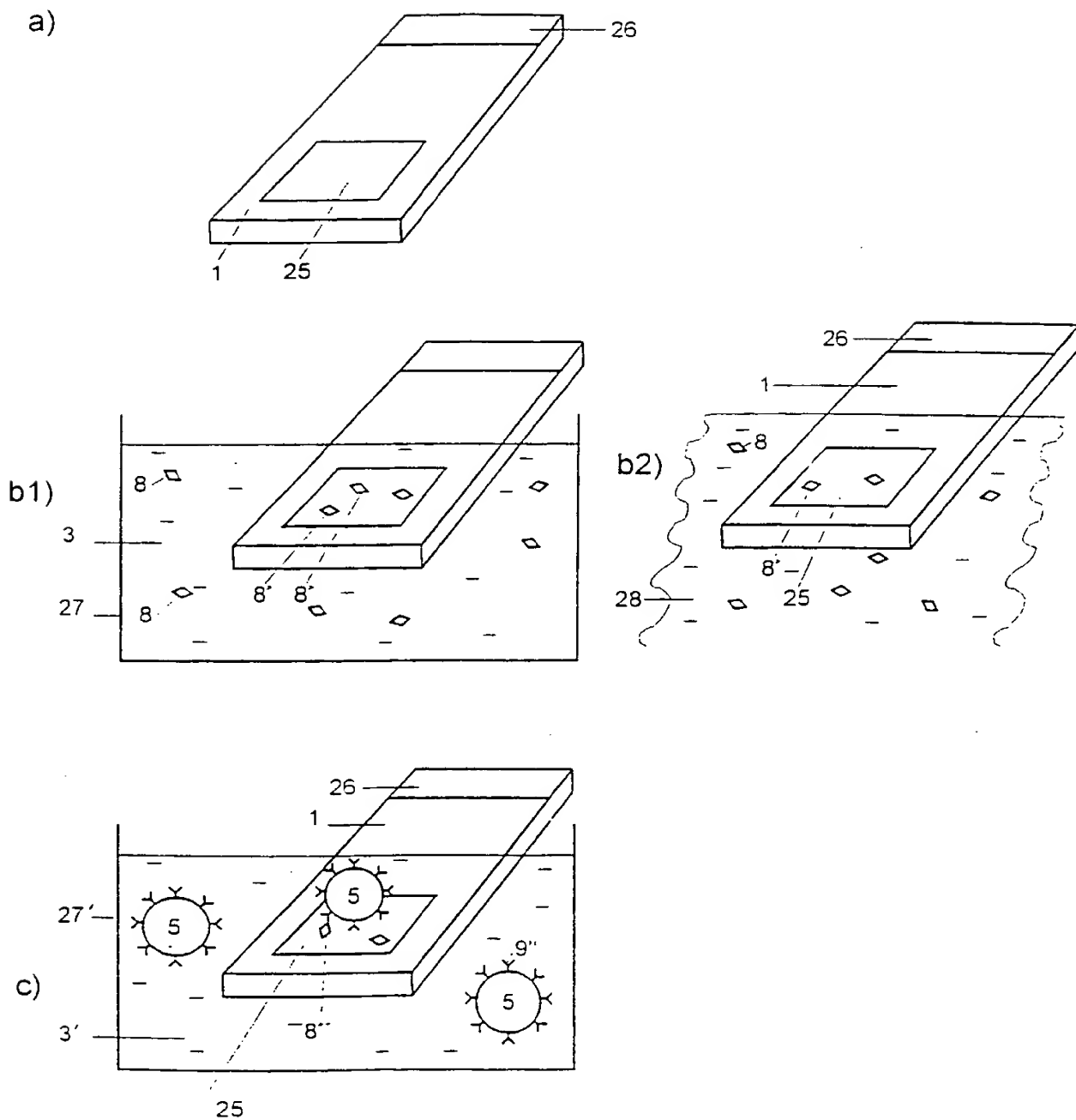


Fig. 18

19 / 35

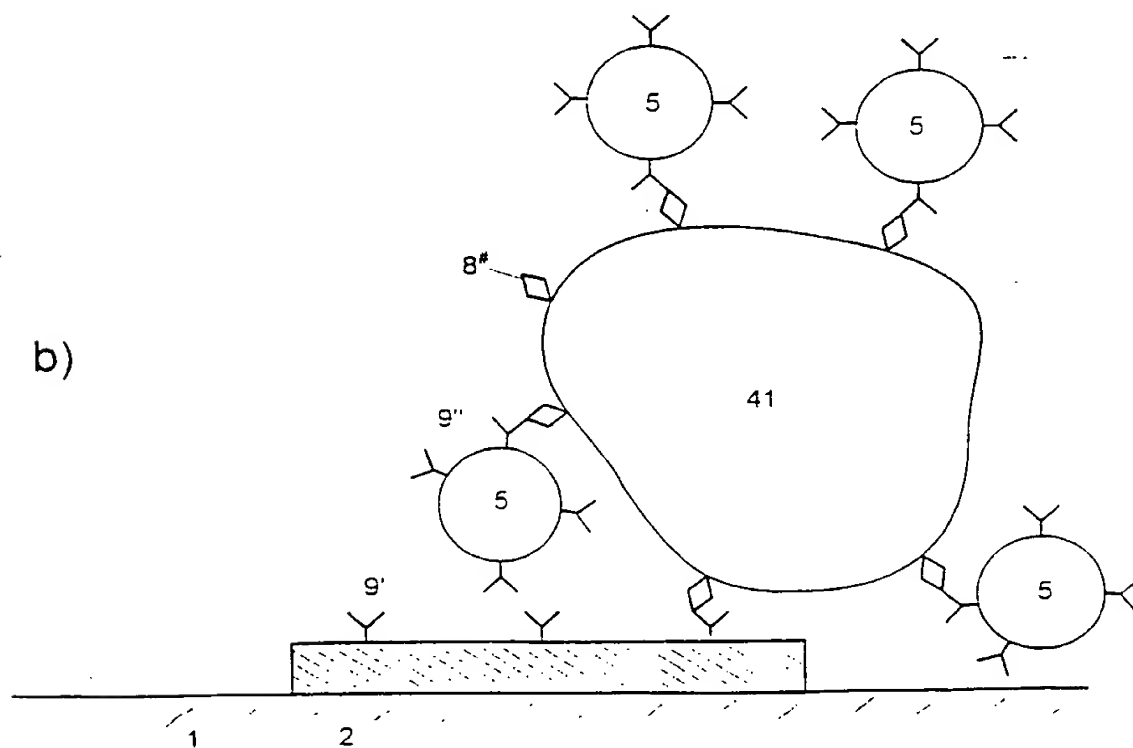
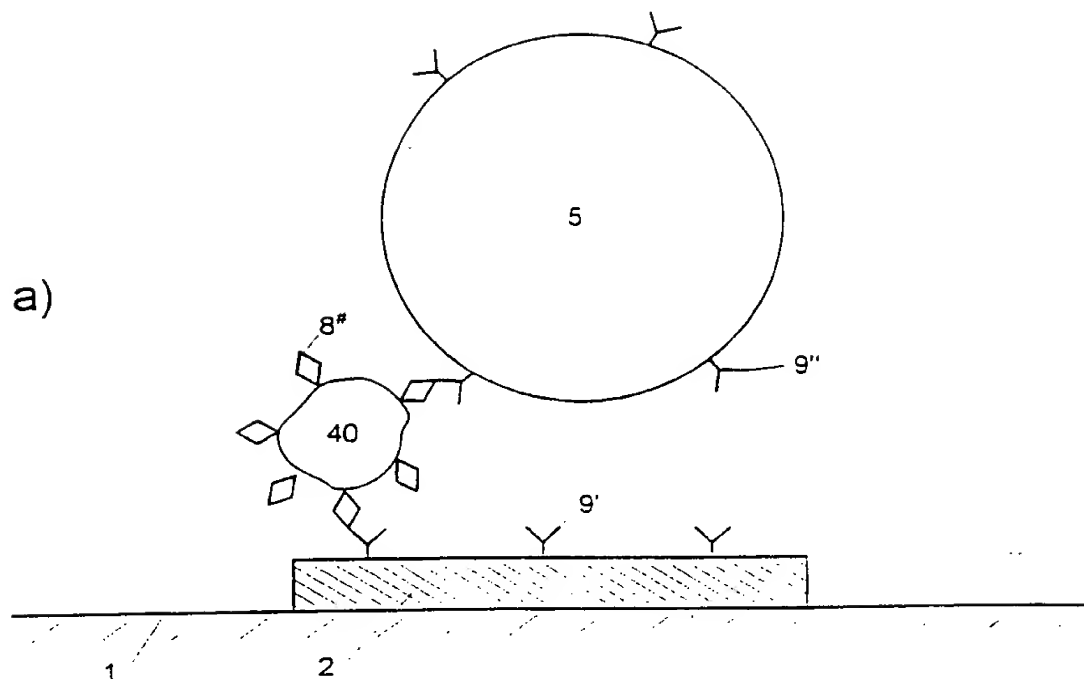


Fig. 19

20/35

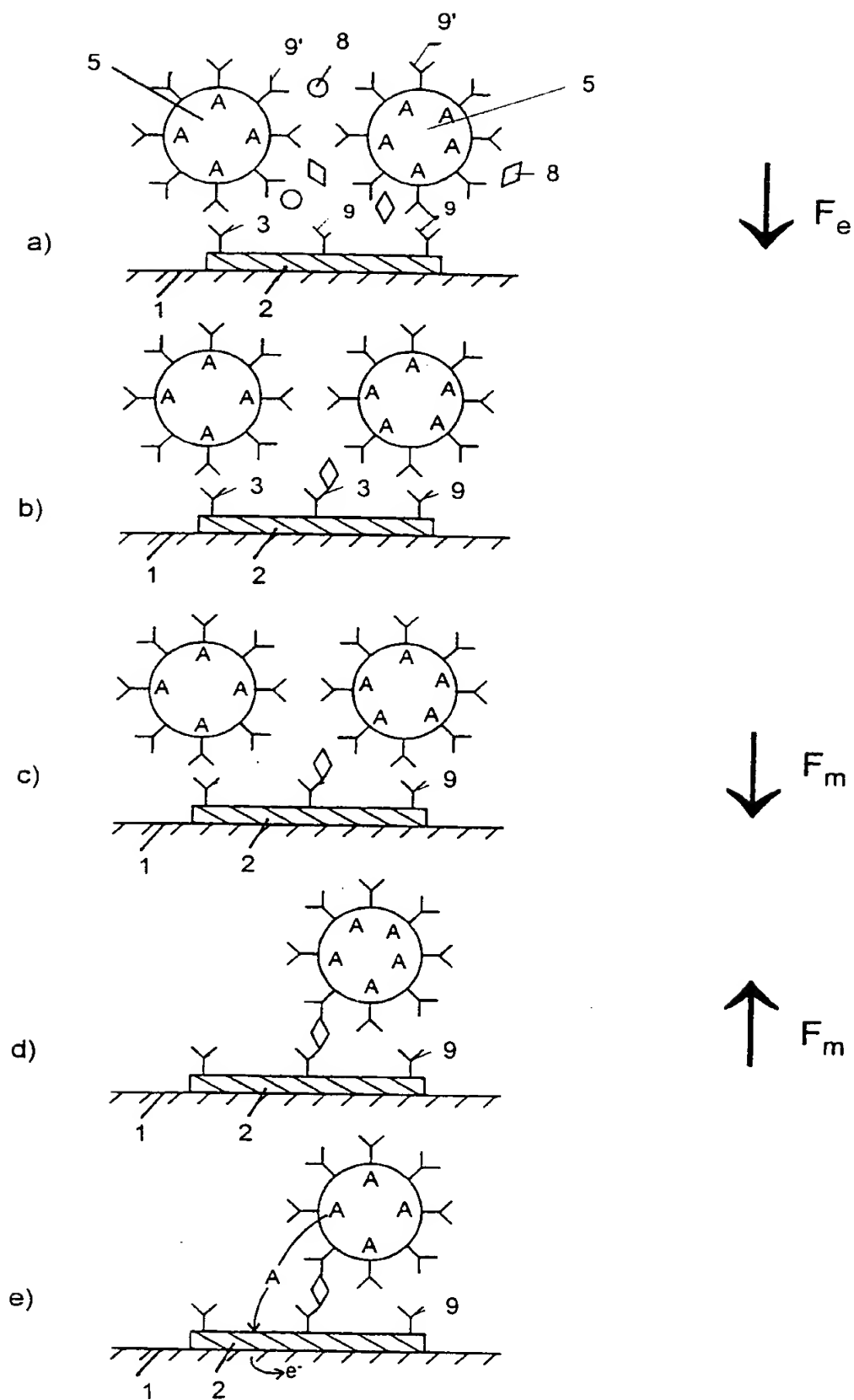


Fig. 20

21/35

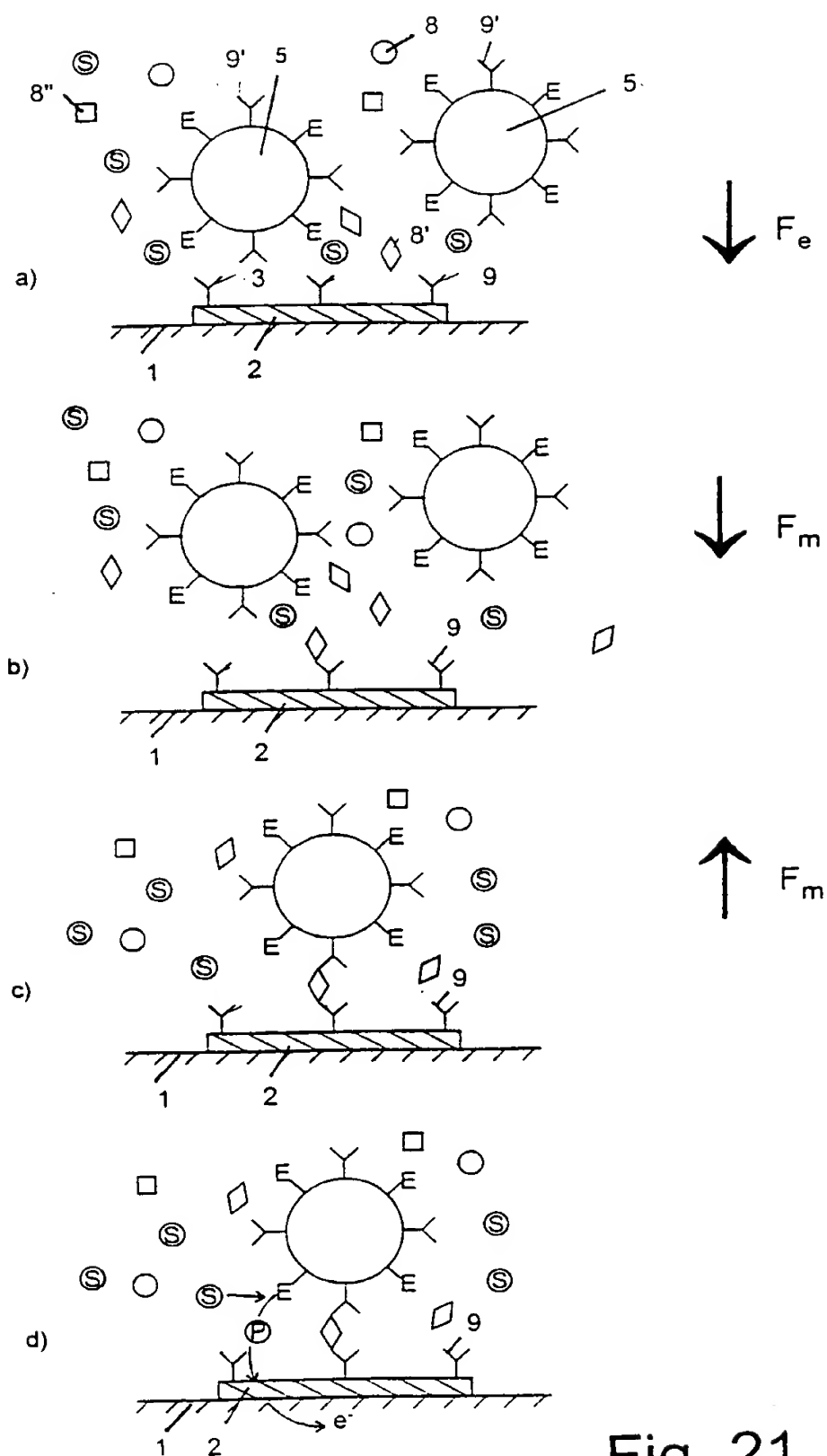


Fig. 21

ERSATZBLATT (REGEL 26)

22/35

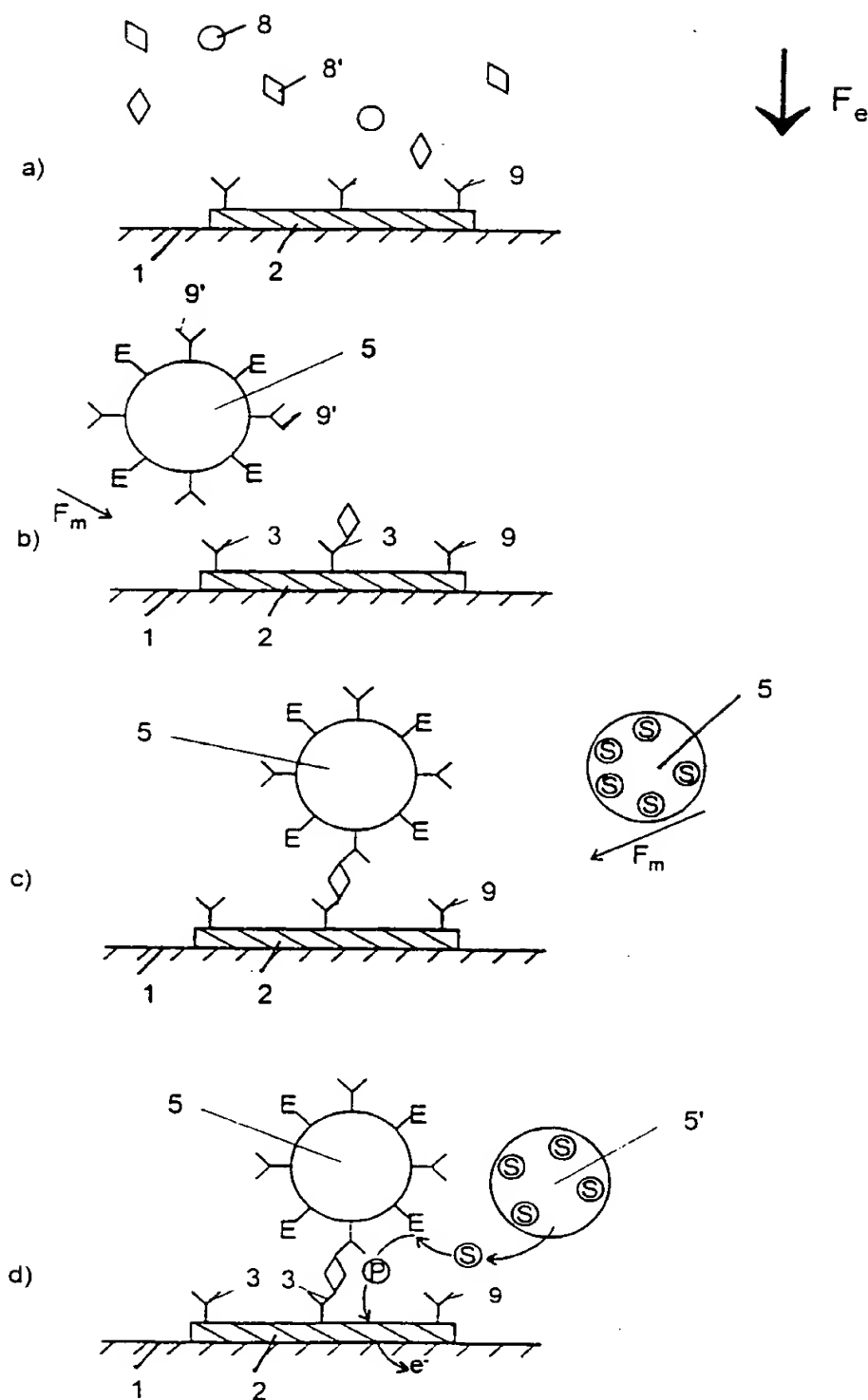


Fig. 22

23 / 35

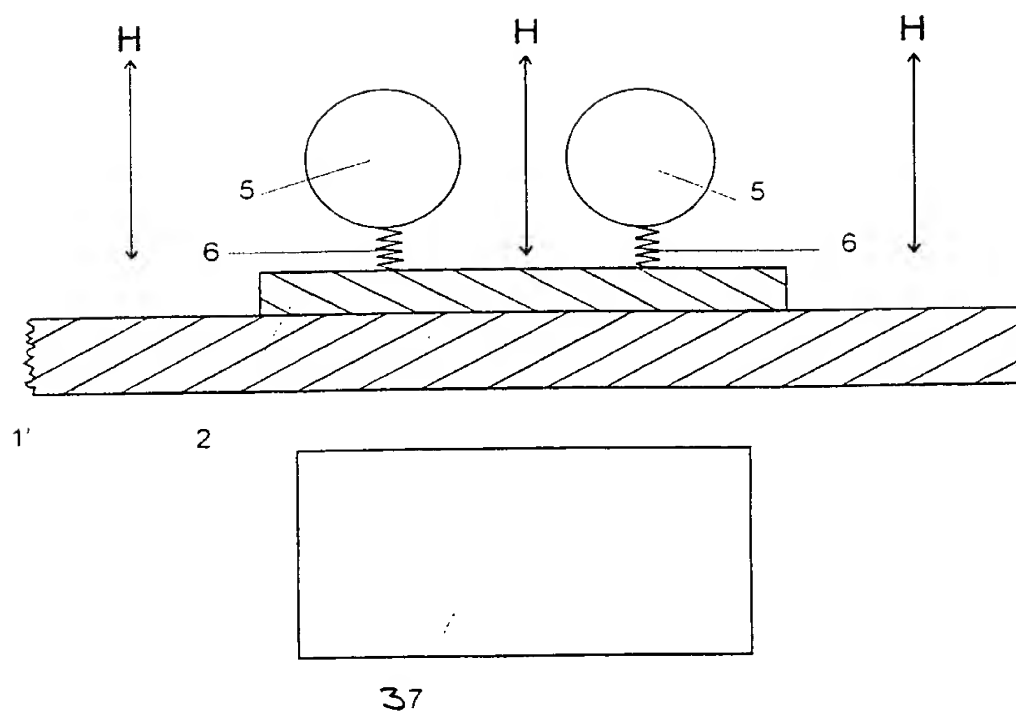


Fig. 23

24/35

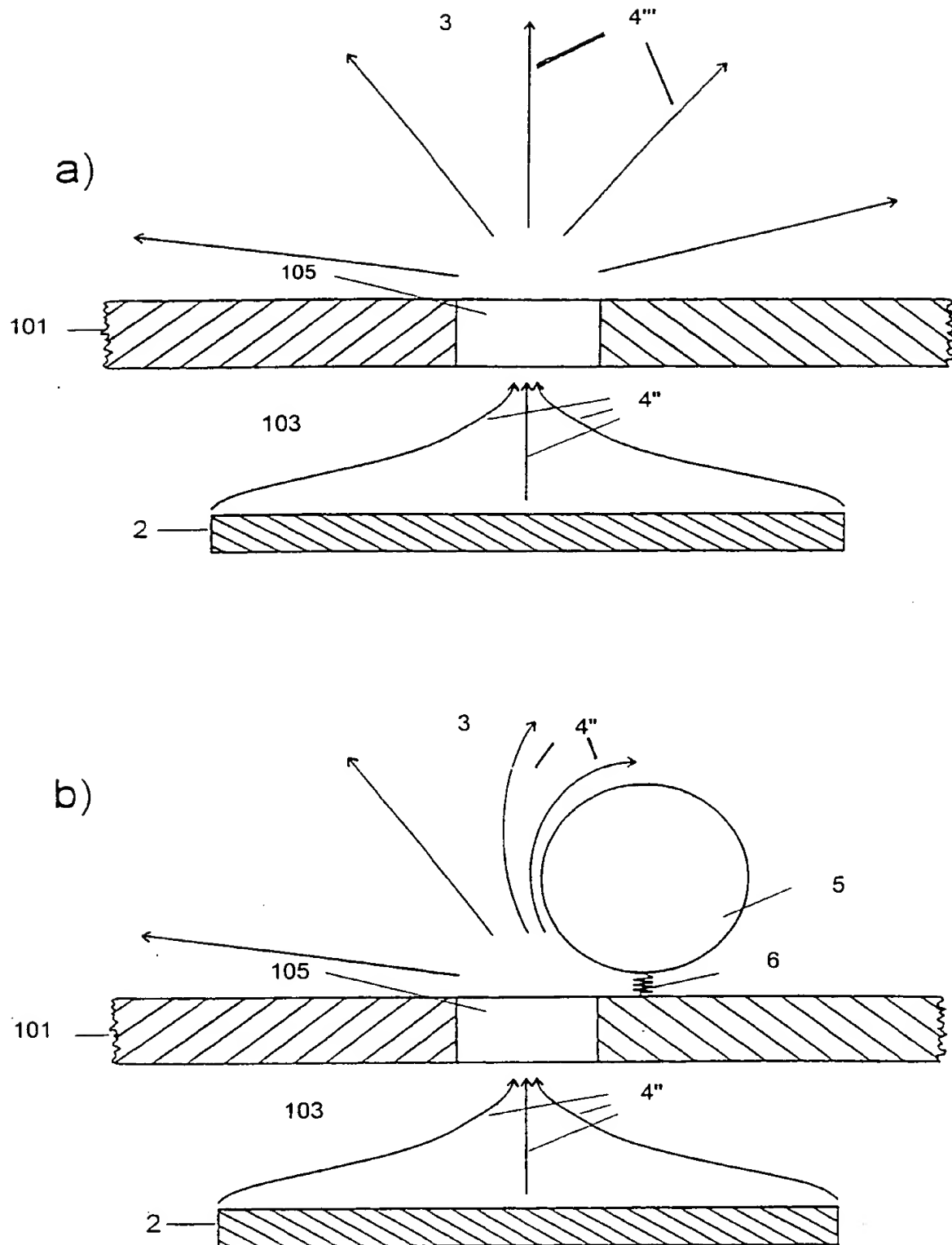


Fig. 24

ERSATZBLATT (REGEL 26)

25/35

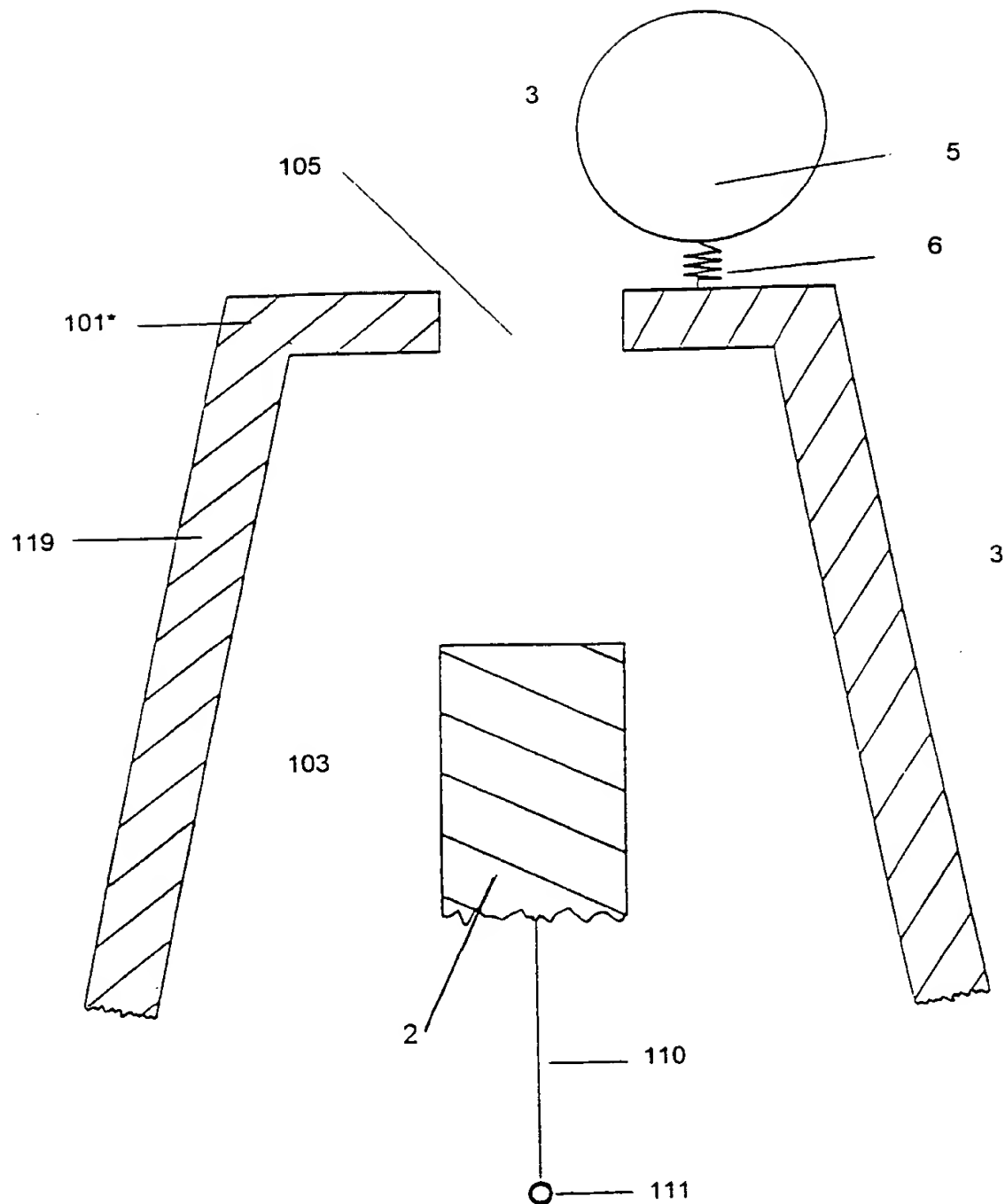


Fig. 25

ERSATZBLATT (REGEL 26)

26/35

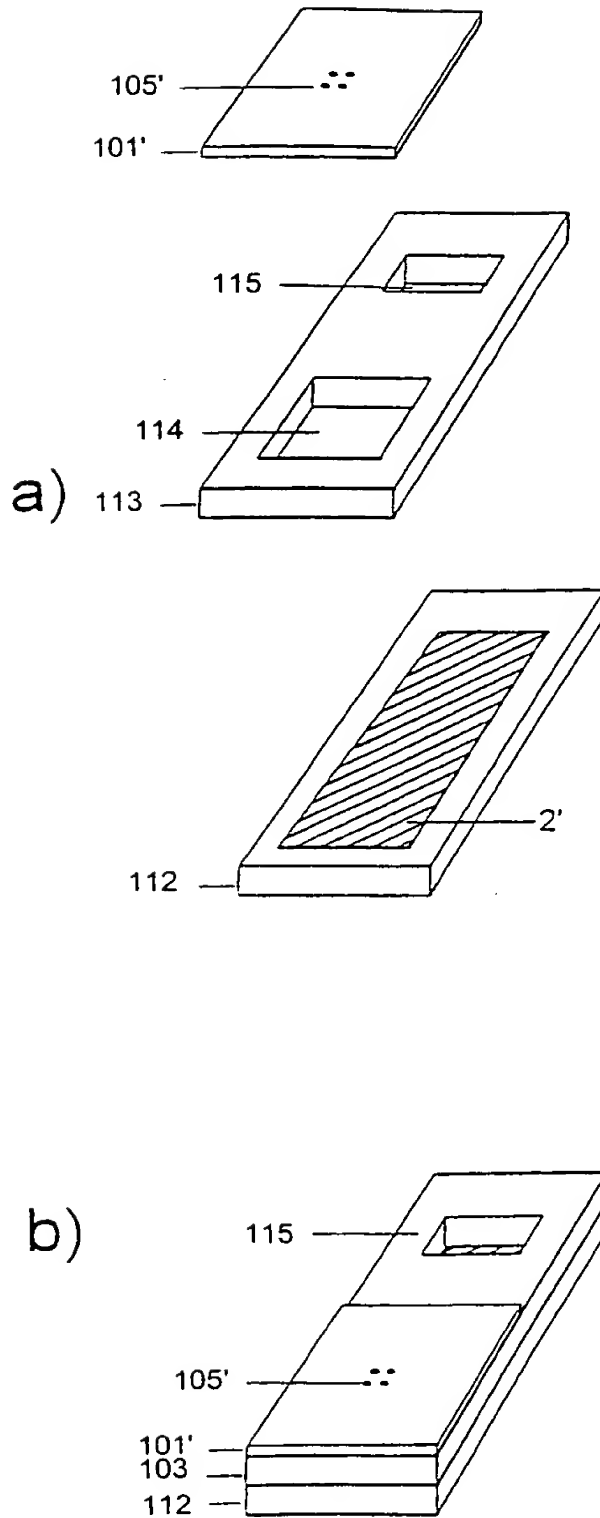


Fig. 26

27/35

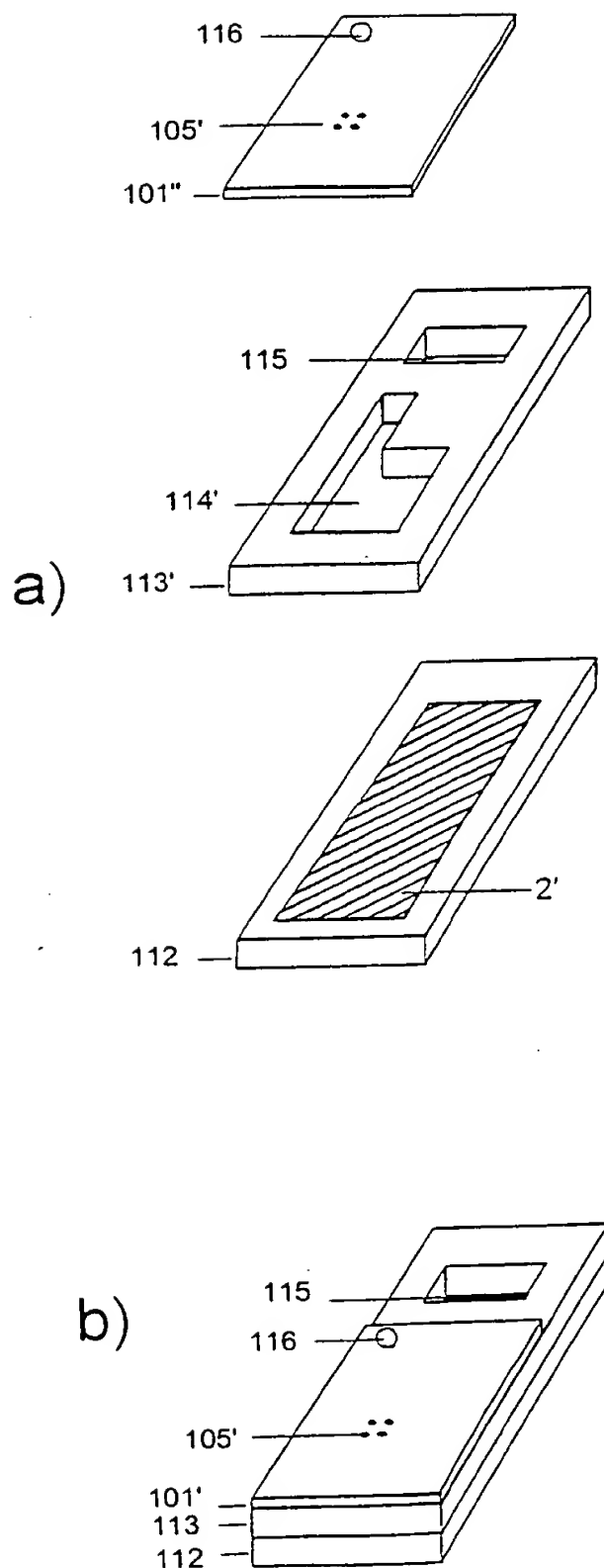


Fig. 27

ERSATZBLATT (REGEL 26)

28/35

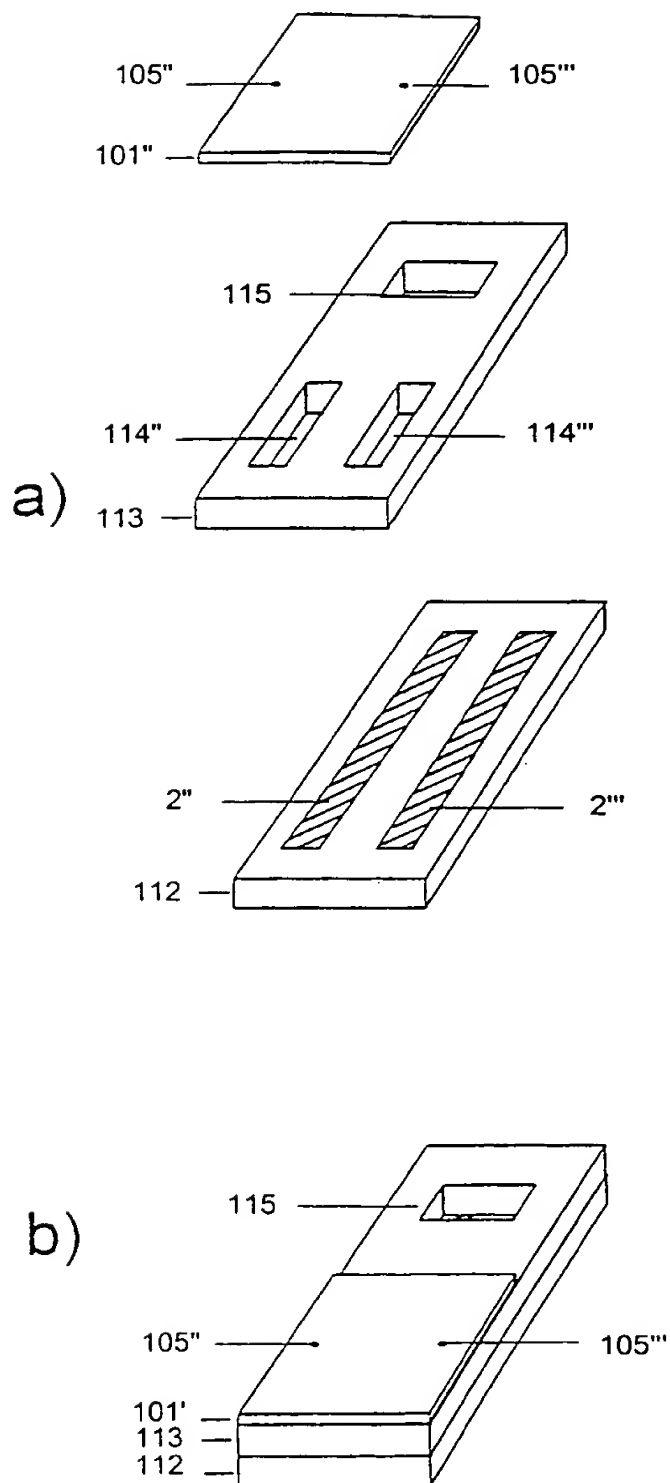


Fig. 28

ERSATZBLATT (REGEL 26)

29/35

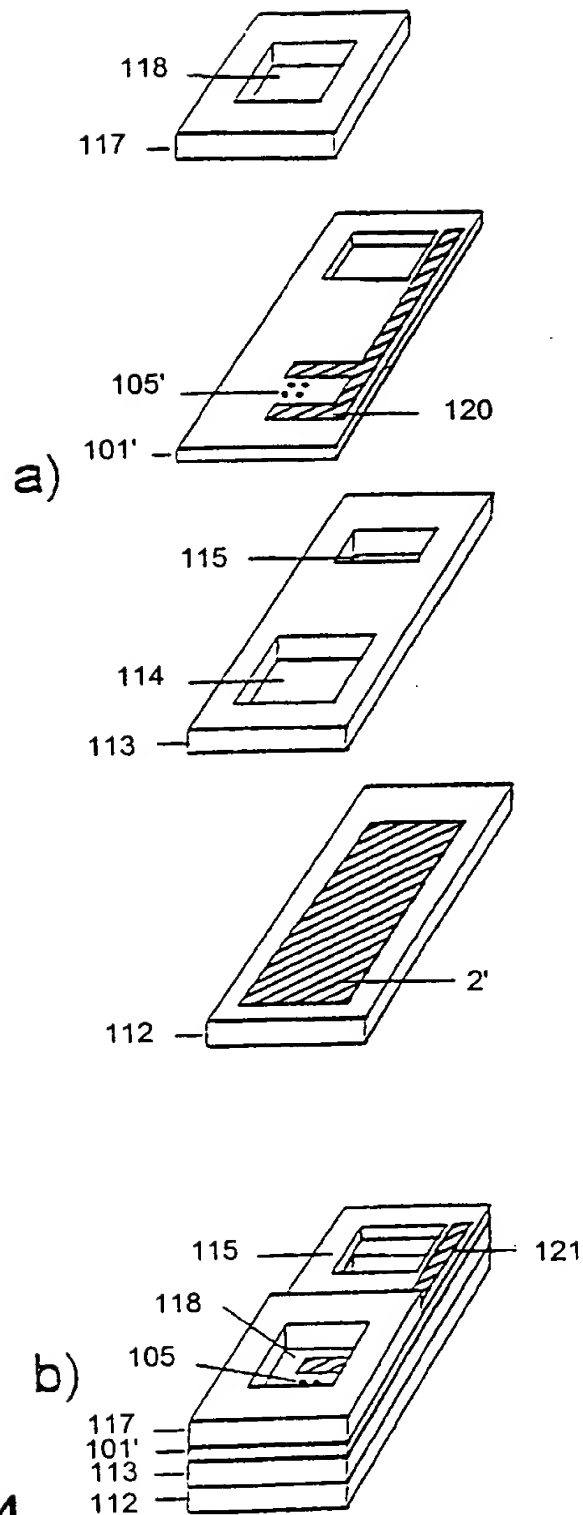


Fig. 24

30/35

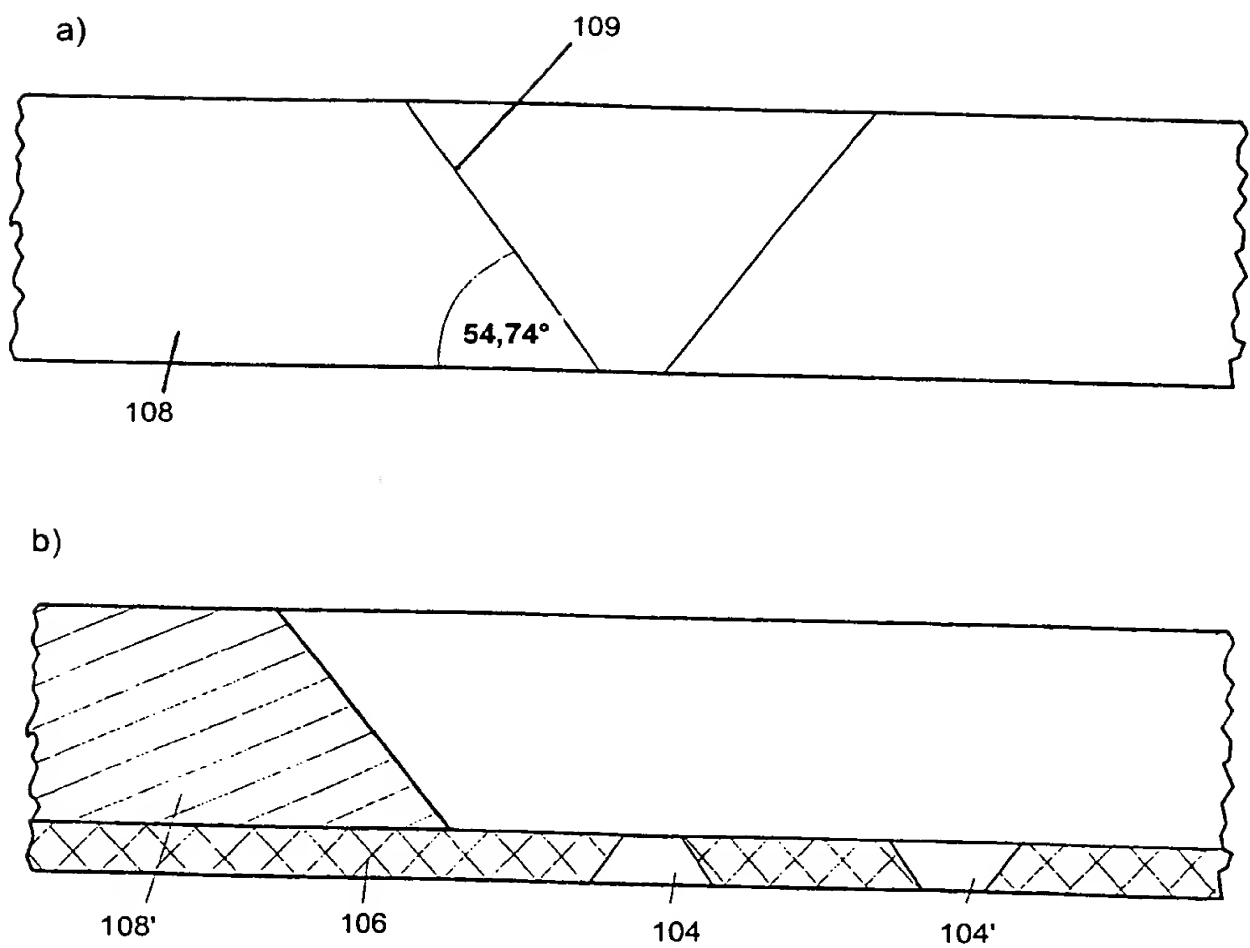


Fig. 30

31/35

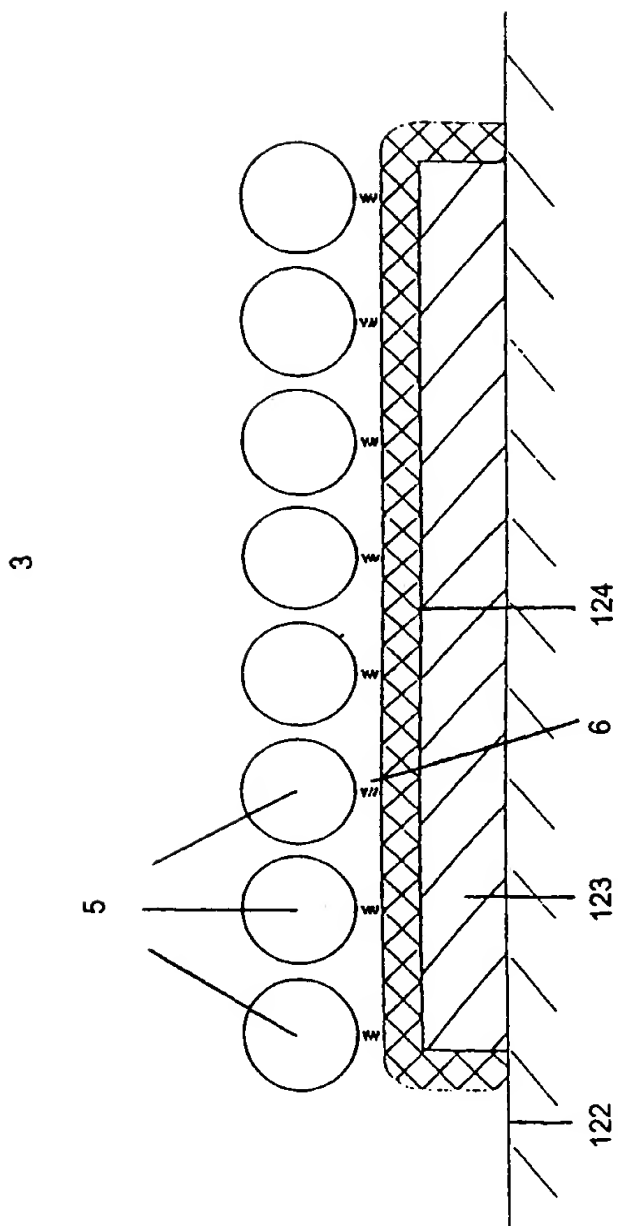


Fig. 31

32/35

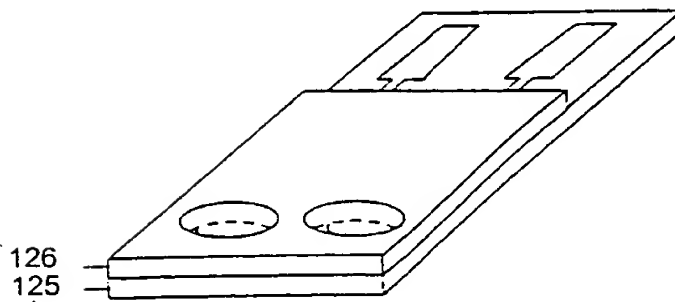
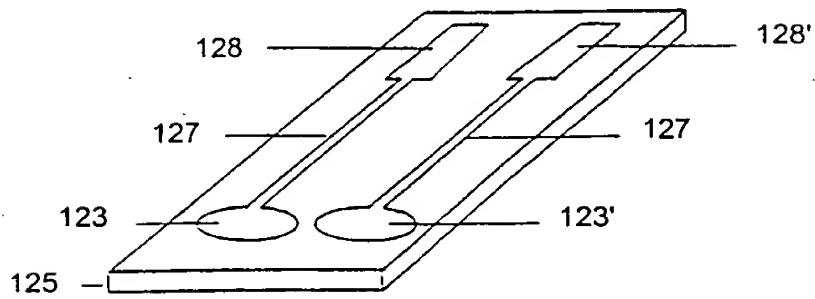
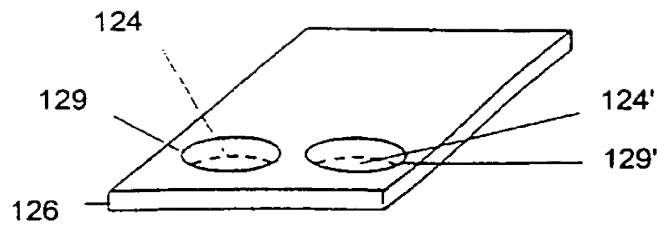


Fig. 32

33/35

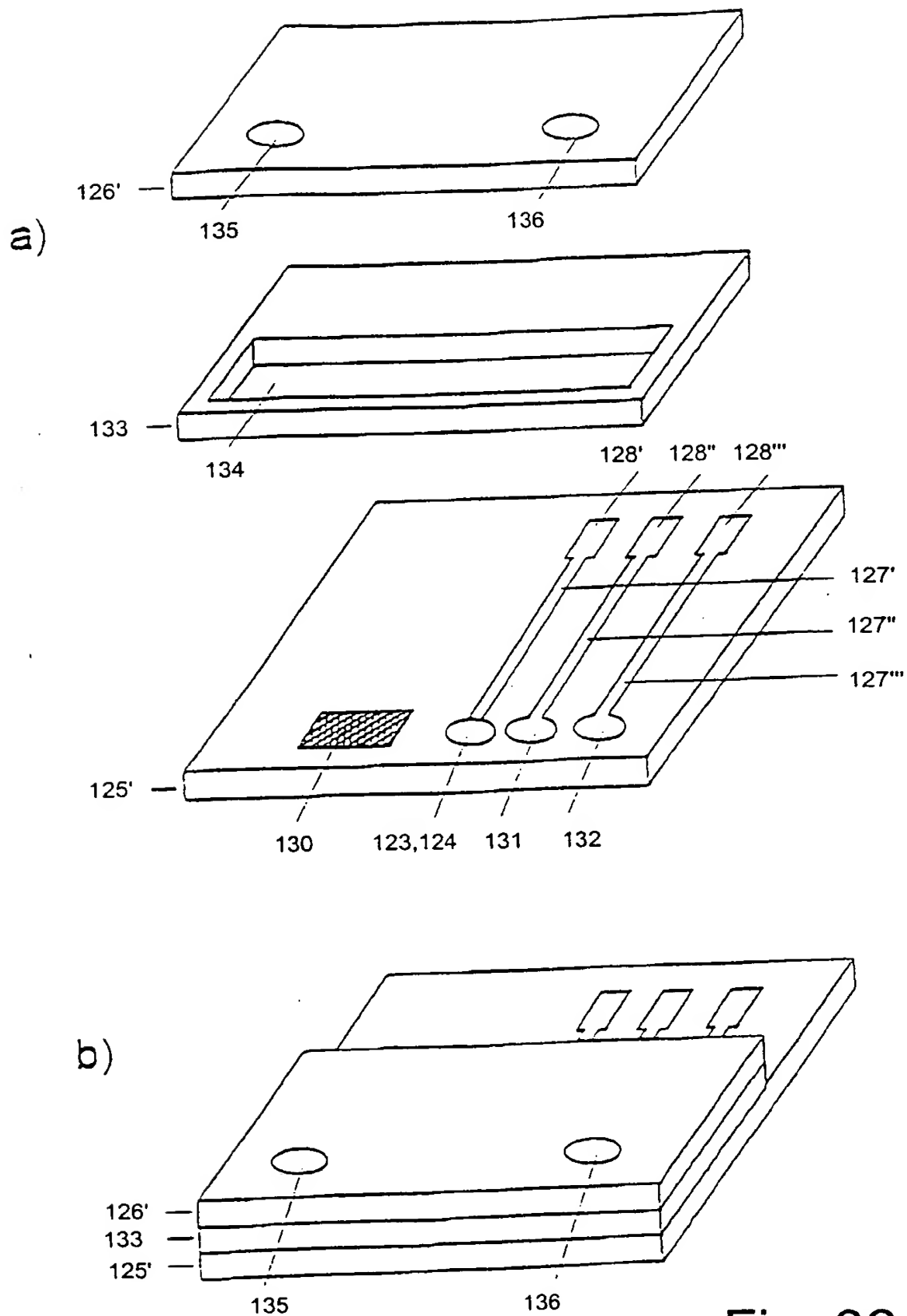


Fig. 33

ERSATZBLATT (REGEL 26)

34/35

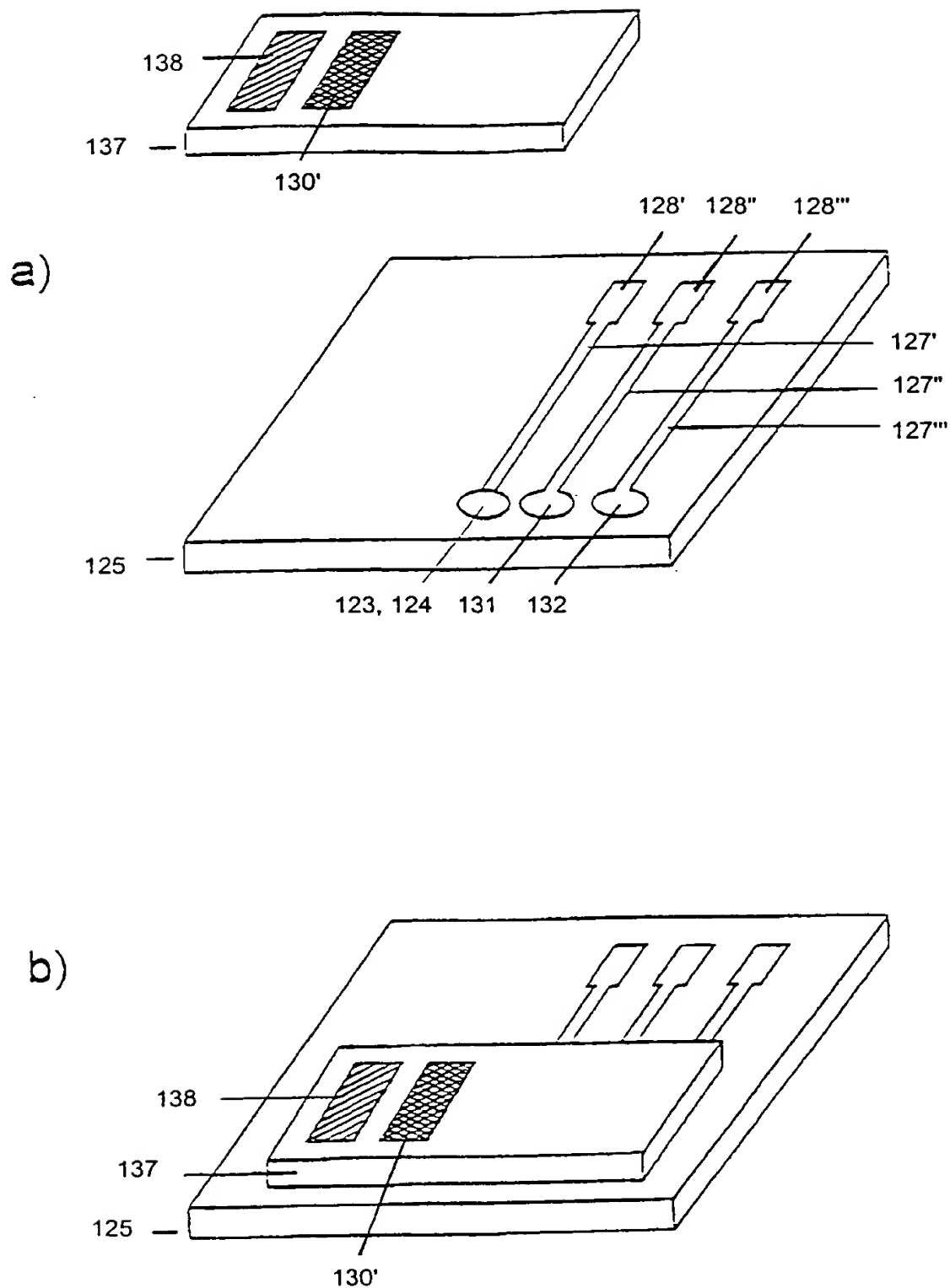


Fig. 34

35 / 35

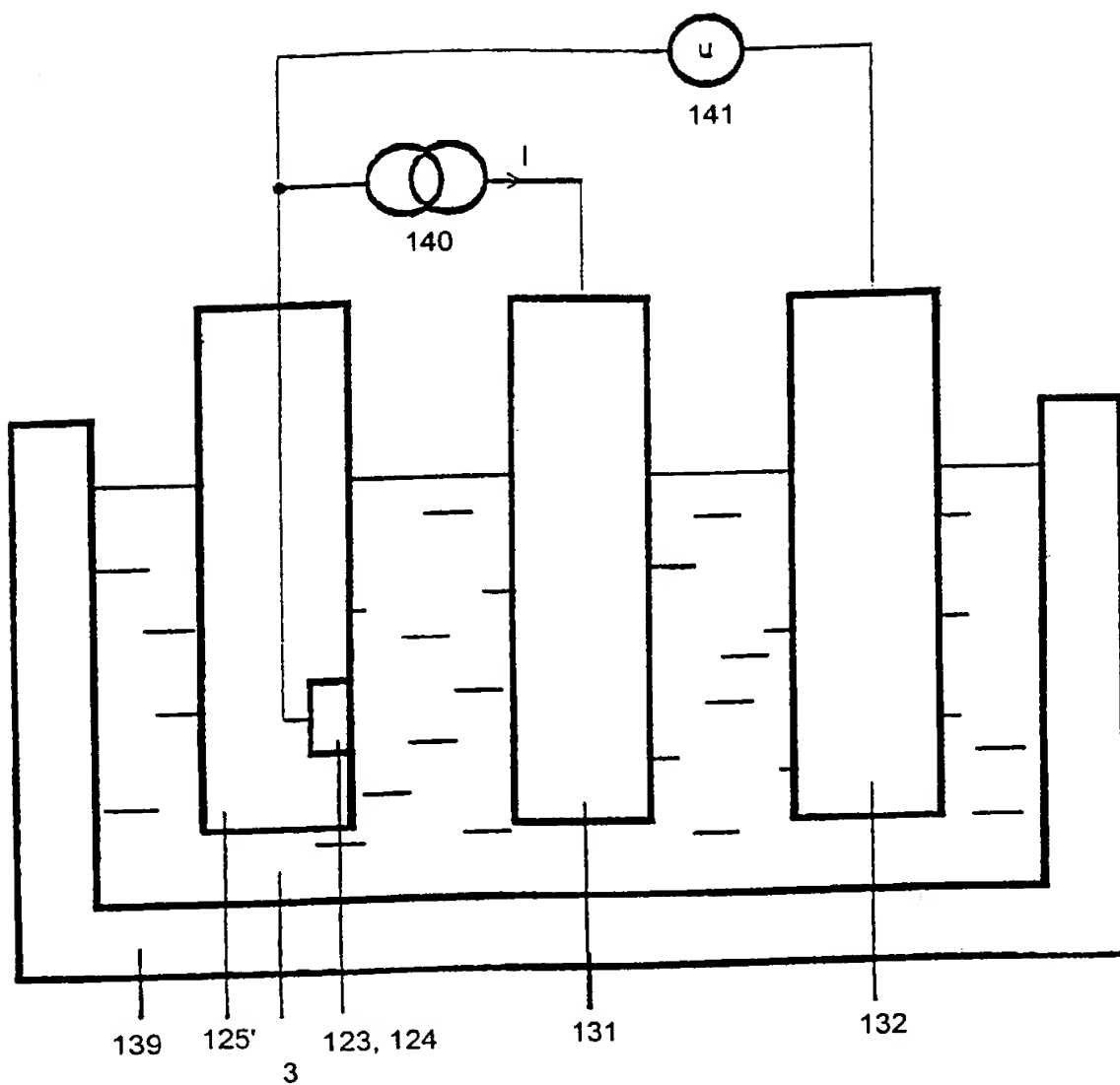


Fig. 35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 98/07494

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/543 G01N27/327

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 90 05300 A (MIDWEST RESEARCH TECHNOLOGIES) 17 May 1990	1
Y	see the whole document ---	2-38
P, Y	WO 97 45740 A (MOTOROLA, INC.) 4 December 1997 see the whole document ---	2-38
Y	EP 0 745 843 A (LG ELECTRONICS, INC.) 4 December 1996 see the whole document ---	2-38
Y	EP 0 402 917 A (BIOCIRCUITS CORPORATION) 19 December 1990 see the whole document ---	2-38
	--- -/--	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 April 1999

Date of mailing of the international search report

07/05/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Griffith, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 98/07494

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 88 09808 A (ARTHUR D. LITTLE, INC.) 15 December 1988 see the whole document ---	1-38
A	EP 0 495 519 A (CANON KABUSHIKI KAISHA) 22 July 1992 see the whole document ---	1-38
A	WO 87 03095 A (THE JOHN HOPKINS UNIVERSITY/APPLIED PHYSICS LABORATORY) 21 May 1987 see the whole document -----	1-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

ional A, ation No

PCT/EP 98/07494

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9005300	A	17-05-1990	AU 4647589 A CA 2002660 A	28-05-1990 10-05-1990
WO 9745740	A	04-12-1997	AU 2681297 A FR 2749391 A	05-01-1998 05-12-1997
EP 745843	A	04-12-1996	JP 2736049 B JP 8327582 A	02-04-1998 13-12-1996
EP 402917	A	19-12-1990	US 5156810 A AT 145064 T CA 2019039 A DE 69029060 D DE 69029060 T JP 2874964 B JP 3128449 A US 5427915 A US 5491097 A US 5622872 A US 5571568 A US 5268305 A	20-10-1992 15-11-1996 15-12-1990 12-12-1996 30-04-1997 24-03-1999 31-05-1991 27-06-1995 13-02-1996 22-04-1997 05-11-1996 07-12-1993
WO 8809808	A	15-12-1988	US 5001048 A EP 0367788 A JP 2503826 T US 5192507 A	19-03-1991 16-05-1990 08-11-1990 09-03-1993
EP 495519	A	22-07-1992	JP 2691267 B JP 5066224 A JP 2652293 B JP 5157749 A DE 69214471 D DE 69214471 T US 5380490 A	17-12-1997 19-03-1993 10-09-1997 25-06-1993 21-11-1996 24-04-1993 10-01-1995
WO 8703095	A	21-05-1987	CA 1259374 A EP 0245477 A JP 63501446 T US 4822566 A	12-09-1989 19-11-1987 02-06-1988 18-04-1989

PCT/EP 98/07494

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 88 09808 A (ARTHUR D. LITTLE, INC.) 15. Dezember 1988 siehe das ganze Dokument ---	1-38
A	EP 0 495 519 A (CANON KABUSHIKI KAISHA) 22. Juli 1992 siehe das ganze Dokument ---	1-38
A	WO 87 03095 A (THE JOHN HOPKINS UNIVERSITY/APPLIED PHYSICS LABORATORY) 21. Mai 1987 siehe das ganze Dokument -----	1-38

INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales A Zeichen

PCT/EP 98/07494

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9005300 A	17-05-1990	AU 4647589 A CA 2002660 A	28-05-1990 10-05-1990
WO 9745740 A	04-12-1997	AU 2681297 A FR 2749391 A	05-01-1998 05-12-1997
EP 745843 A	04-12-1996	JP 2736049 B JP 8327582 A	02-04-1998 13-12-1996
EP 402917 A	19-12-1990	US 5156810 A AT 145064 T CA 2019039 A DE 69029060 D DE 69029060 T JP 2874964 B JP 3128449 A US 5427915 A US 5491097 A US 5622872 A US 5571568 A US 5268305 A	20-10-1992 15-11-1996 15-12-1990 12-12-1996 30-04-1997 24-03-1999 31-05-1991 27-06-1995 13-02-1996 22-04-1997 05-11-1996 07-12-1993
WO 8809808 A	15-12-1988	US 5001048 A EP 0367788 A JP 2503826 T US 5192507 A	19-03-1991 16-05-1990 08-11-1990 09-03-1993
EP 495519 A	22-07-1992	JP 2691267 B JP 5066224 A JP 2652293 B JP 5157749 A DE 69214471 D DE 69214471 T US 5380490 A	17-12-1997 19-03-1993 10-09-1997 25-06-1993 21-11-1996 24-04-1993 10-01-1995
WO 8703095 A	21-05-1987	CA 1259374 A EP 0245477 A JP 63501446 T US 4822566 A	12-09-1989 19-11-1987 02-06-1988 18-04-1989

THIS PAGE BLANK (USPTO)